

*Este exemplar
foi devolvido corrigido
conforme resolução CCPG/036/83
Piracicaba 18/12/96*

SERGIO LUIZ DE ALMEIDA ROCHELLE

**INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA EXTRAÇÃO
DE PROTEÍNAS INTRACELULARES DE LEVEDURAS
DO GÊNERO *CANDIDA* ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL
PARA APLICAÇÃO EM PAGE-SDS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental (Área de Microbiologia) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

PIRACICABA – SP
– 1996 –

R585i
30296/BC

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE CAMPINAS
BIBLIOTECA CENTRAL

SERGIO LUIZ DE ALMEIDA ROCHELLE

**INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA EXTRAÇÃO
DE PROTEÍNAS INTRACELULARES DE LEVEDURAS
DO GÊNERO *CANDIDA* ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL
PARA APLICAÇÃO EM PAGE-SDS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental (Área de Microbiologia) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador Prof. Dr. José Francisco Höfling - FOP-UNICAMP

PIRACICABA – SP
– 1996 –

93.03956

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	7/unicamp
R585i	
V.	Es.
TOMBO BC/	30296
PROC.	21/05/93
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	21/05/93
N.º CPD	

CM-00098275-8

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

R585i

Rochelle, Sergio Luiz de Almeida.

Influência do meio de cultura na extração de proteínas intracelulares de leveduras do gênero *Candida* isoladas de cavidade oral para aplicação em PAGE-SDS / Sergio Luiz de Almeida Rochelle. - Piracicaba : [s.n.], 1996.

152 f. : il.

Orientador : José Francisco Höfling.

Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Odontologia* 2. Microbiologia Médica* 3. Micologia Médica* 4. Eletroforese em gel.* I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

19.CDD - 617.6

- 616.01

- 589.2

- 574.88

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Odontologia	617.6
2. Microbiologia Médica	616.01
3. Micologia Médica	589.2
4. Eletroforese em gel	574.88



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 19/11/96, considerou o candidato aprovado.

1. José Francisco Hofling

A stylized signature of José Francisco Hofling, consisting of a series of sharp, angular strokes.

2. Mário Tsunezi Shimizu

A stylized signature of Mário Tsunezi Shimizu, featuring a large, flowing loop and a horizontal stroke.

3. Gisleine Garcia Franco do Nascimento

A stylized signature of Gisleine Garcia Franco do Nascimento, with a large, sweeping 'G' and a horizontal stroke.

AGRADECIMENTOS

Agradecer somente todo o ensinamento recebido de um Professor e um Mestre, realmente é muito pouco.

Muito do que foi aprendido, é parte do que ele nos quis mostrar. Os acertos, certamente são seus e os erros, nossas meras tentativas de alcançá-lo.

Meus Agradecimentos

a meus avós

Henrique e Maria Amélia

Elpídio e Alice

a meus pais

Sergio e Wilma

que pelo exemplo de luta constante,
sempre mostraram caminhos a seguir.

à minha esposa

Marta Cecília

que dividiu as alegrias e percalços
deste trabalho, sempre incentivando
e participando para que o mesmo
pudesse concretizar-se.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a grande ajuda de todos os que auxiliaram para que este trabalho pudesse ser realizado. Pelas suas orientações, sugestões, incentivo, fornecimento de material e críticas, contribuíram enormemente para a sua existência.

- Prof. Dr. José Francisco Höfling, meu orientador
- Prof^a Denise Madalena Palomari
- Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP
- Professores Doutores do Curso de Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP
- Prof. Dr. Antônio Olavo Cardoso Jorge – UNESP – S.J. dos Campos
- Prof. Dr. Sérgio R. P. Liçe – FOP – UNICAMP
- Prof^a Dra. Maricê Nogueira de Oliveira – USP – SP
- Prof. Paulo César Vertoni – ESALQ – USP
- Prof. Dr. Renato Baruffaldi – USP – SP
- Prof. Edvaldo A. R. Rosa
- Conselho Nacional de Pesquisas – CNPq
- FAEP – processo 1005/92 26/92;
- Funcionários da FOP – UNICAMP
- Bibliotecárias e funcionários das Bibliotecas da FOP/ UNIMEP/ ESALQ/ ICB - USP/ FMUSP, em especial as Sras. Heloísa, Luzia e Hilda
- Xerox da FOP - UNICAMP – Sr. Francisco César Barbosa Maia

- DEPAN da UNICAMP de Campinas - Prof. Dr. Carlos Grosso e ao técnico Francisco Carraro
- Depto. de Hidrologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelo fornecimento do nitrogênio líquido
- Depto. de Genética da ESALQ – Prof. Dr. Flávio Tavares e Prof. Luís H. Gomes
- Aos funcionários da Área de Microbiologia e Imunologia da FOP - UNICAMP – Elza Maria Thomazini e Wilma Correa Ferraz
- Agradecimento especial ao técnico Anderson Laerte Teixeira, pelos serviços de computação
- À digitadora Sra. Joselene Rodrigues Monteiro, pelos excelentes serviços de montagem da Tese e digitação
- Ao Sr. André Piccollomini, pela confecção do *Abstract*
- Aos fotógrafos da FOP-UNICAMP e UNIMEP – Pedro e Nascimento.

e ainda a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente na concretização deste trabalho,

o meu sincero agradecimento,

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	1
LISTA DE ESQUEMAS	2
LISTA DE TABELAS	2
LISTA DE FIGURAS	3
RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. História	13
2.2. Ecologia	19
2.3. Caracteres Gerais	29
2.4. Classificação das leveduras	34
2.5. Eletroforese	51
2.5.1. Emprego da técnica eletroforética	54
2.5.1.1. Técnicas eletroforéticas utilizadas na identificação de fungos e leveduras do gênero <i>Candida</i>	56
2.5.1.2. Técnicas moleculares diversas utilizadas na identificação de microorganismos e leveduras do gênero <i>Candida</i>	73
3. MATERIAIS E MÉTODOS	79
3.1. Características das cepas utilizadas	79
3.1.1. Procedência	79
3.1.2. Manutenção das amostras	79
3.1.3. Caracterização das amostras	80
3.2. Método de preparo das amostras	81
3.2.1. Preparação do material para a extração das proteínas intracelulares	81
3.2.2. Extração das proteínas dos componentes intracelulares pelo método da criofratura celular em N ₂ líquido, segundo HWANG (1966) e tampão da amostra segundo BRUNEAU & GUINET (1989)	83
3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)	83

4.	RESULTADOS	85
4.1.	Resultado do perfil eletroforético em PAGE-SDS das proteínas intracelulares (Figs. 1 a 15) e respectivos diagramas representativos (Diagramas 1A a 12A) das diferentes amostras de leveduras submetidas a crescimentos nos diversos meios de cultura utilizados	85
4.2.	Resultado das densitometrias de integralização da área dos géis de PAGE-SDS e respectivas porcentagens comparativas de extração de proteínas de componentes intracelulares das 12 amostras de leveduras submetidas a crescimento em meios de cultura diversos	99
4.3.	Dendrogramas comparativos das relações entre as espécies, com base na leitura dos perfis eletroforéticos em PAGE-SDS das proteínas intracelulares de células leveduriformes submetidas a crescimento em meios de cultura diversos	107
5.	DISCUSSÃO	111
6.	CONCLUSÕES	118
	ANEXOS	120
	Anexo I	120
	Anexo II	122
	Anexo III	125
	SUMMARY	127
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais aspectos da evolução histórica a respeito das leveduras	18
Quadro 2. Fatores relacionados com a candidíase	22
Quadro 3. Fatores que predis põem à candidose oral	25
Quadro 4. Classificação das candidoses orais	26
Quadro 5. Testes para identificar desordens das infecções leveduriformes	27
Quadro 6. Procedimentos técnicos para o diagnóstico da candidose oral	28
Quadro 7. Fatores possivelmente envolvidos na proteção contra as infecções contra leveduras do gênero <i>Candida</i>	29
Quadro 8. Identificação rápida de leveduras do gênero <i>Candida</i> (segundo E. Drouhet)	34
Quadro 9. Taxonomia dos fungos baseada na parede celular	45
Quadro 10. Técnicas eletroforéticas e graus de resolução	58
Quadro 11. Relação das espécies e variedade de leveduras bucais utilizadas nos experimentos	79
Quadro 12. Graus de resolução das técnicas de biologia molecular	113

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	1. Método de preparo das amostras de leveduras do gênero <i>Candida</i> para extração de proteínas intracelulares	82
---------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela	1. Porcentagens da extração de proteínas obtidas para cada uma das 12 (doze) amostras cultivadas em 6 (seis) meios de cultura	100
--------	---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 1-b de <i>Candida tropicalis</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	87
Figura 1A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 1-b de <i>C. tropicalis</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	87
Figura 2.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-430 de <i>Candida tropicalis</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	88
Figura 2A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-430 de <i>C. tropicalis</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	88
Figura 3.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra F-72 de <i>Candida albicans</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	89
Figura 3A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra F-72 de <i>C. albicans</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	89
Figura 4.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra E-37 de <i>Candida albicans</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	90
Figura 4A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra E-37 de <i>C. albicans</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	90
Figura 5.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 97-a de <i>Candida albicans</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	91

Figura 5A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 97-a de <i>C. albicans</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	91
Figura 6.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 17-b de <i>Candida albicans</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	92
Figura 6A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 17-b de <i>C. albicans</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	92
Figura 7.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-152 de <i>Candida guilliermondii</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	93
Figura 7A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-152 de <i>C. guilliermondii</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	93
Figura 8.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-405 de <i>Candida guilliermondii</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	94
Figura 8A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-405 de <i>C. guilliermondii</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	94
Figura 9.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 21-c de <i>Candida parapsilosis</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	95
Figura 9A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 21-c de <i>C. parapsilosis</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	95

Figura 10.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 7-a de <i>Candida parapsilosis</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	96
Figura 10A.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 7-a de <i>Candida parapsilosis</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	96
Figura 11.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra IM-90 de <i>Candida krusei</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	97
Figura 11A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra IM-90 de <i>C. krusei</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	97
Figura 12.	Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 4-c de <i>Candida krusei</i> submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).....	98
Figura 12A.	Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 4-c de <i>C. krusei</i> (colunas 1 a 6), <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).	98
Figura 13.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de <i>C. tropicalis</i> submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.....	101
Figura 14.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de <i>C. albicans</i> submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.	102

Figura 15.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de <i>C. albicans</i> submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.....	102
Figura 16.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de <i>C. parapsilosis</i> submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.....	103
Figura 17.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de <i>C. krusei</i> submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.....	103
Figura 18.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (M.C.L.).....	104
Figura 19.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (B.S.M.A.)	104
Figura 20.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (A.S.D.)	105
Figura 21.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (P.L.)	106
Figura 22.	Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (A.S.F.).....	106
Figura 23.	Densitometria de integralização da área dos géis de	

	PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio <i>Candida</i> BCG Agar Base (BCG).....	107
Figura 24.	Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as 12 amostras de leveduras do gênero <i>Candida</i> obtidas após crescimento no Meio Completo para Leveduras (M.C.L.).....	108
Figura 25.	Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero <i>Candida</i> obtidas após crescimento no meio de cultura Bacto Sabouraud Maltose Agar (B.S.M.A.).....	108
Figura 26.	Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero <i>Candida</i> obtidas após crescimento no meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (A.S.D.)	109
Figura 27.	Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero <i>Candida</i> obtidas após crescimento no meio de cultura Pagano Levin (P.L.).....	109
Figura 28.	Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero <i>Candida</i> obtidas após crescimento no meio de cultura Agar Seletivo para Fungos (A.S.F.).....	110
Figura 29.	Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero <i>Candida</i> obtidas após crescimento no meio de cultura <i>Candida</i> BCG Agar Base (BCG)	110

RESUMO

Os fungos, especialmente as leveduras do Gênero *Candida*, são agentes potencialmente patogênicos, capazes de provocar inúmeras doenças nos seres vivos, em especial quando se aproveitam da queda da resistência orgânica, sendo considerados oportunistas. Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, parece oportuno, a crescente ampliação de pesquisas com esses microorganismos, os quais têm sido estudados do ponto de vista fisiológico, bioquímico, sorológico, genético, etc. Na cavidade oral, são responsáveis por doenças que afetam as diversas estruturas bucais, justificando o crescente aumento de casos clínicos e de investigações nessa área.

Dentre as técnicas que têm sido empregadas com o objetivo de identificar e caracterizar melhor esses organismos, as de Biologia Molecular desempenham, um poderoso papel investigativo. A PAGE-SDS, tem se mostrado uma técnica importante nos estudos de identificação e caracterização desses microorganismos. Contudo, a grande diversidade de metodologias que são empregadas para obterem-se componentes intracelulares protéicos desses organismos, além de outros fatores, como meios de cultivo, condições de temperatura, pH, etc. — que influenciam o seu desenvolvimento — sugerem a necessidade da padronização e escolha daquela que possa ser a mais adequada à amostra a ser estudada.

O presente trabalho teve como objetivo básico, estudar a influência de alguns meios de cultura usados para o desenvolvimento de células leveduriformes, objetivando a obtenção de proteínas dos componentes intracelulares para aplicação em eletroforese, com ênfase no estudo do perfil eletroforético desses microorganismos.

Amostras de leveduras, de diferentes espécies do gênero *Candida*, isoladas coletadas da cavidade oral, foram submetidas a crescimento em seis meios de culturas diversos. Após o desenvolvimento celular, o lisado protéico solúvel, obtido pela extração com o nitrogênio líquido e com o uso da mistura

dissociante de Bruneau & Guinet (1989), foi submetido à PAGE-SDS. Os padrões eletroforéticos obtidos, forneceram diagramas e foram tratados computacionalmente, originando gráficos das respectivas densitometrias de integralização da área dos géis, com as porcentagens de extração das proteínas para cada amostra de meio de cultura, além dos respectivos dendrogramas comparativos, permitindo uma análise das relações de similaridade entre as amostras em questão, como um estudo preliminar.

Os resultados demonstram que a composição e as características dos meios de cultura utilizados como suporte para o desenvolvimento celular, **interferem** na extração de proteínas dos componentes intracelulares desses microorganismos. O perfil eletroforético exibido pelas espécies são **diversificados qualitativa e quantitativamente** quando comparados. A concentração de proteínas resultantes da extração dos componentes intracelulares leveduriformes, visualizadas pelo perfil eletroforético e reforçados pelas respectivas densitometrias de integralização da área dos géis de PAGE-SDS, são **diferentes qualitativamente**, para os meios de cultura utilizados. Os dendrogramas indicativos do grau de porcentagem de similaridade entre as espécies analisadas, apresentam **grande variabilidade**, levando a **diversificadas interpretações** do ponto de vista do relacionamento entre elas. Os dados obtidos e expressos nessa pesquisa, apontam para a **necessidade de padronização e escolha de uma metodologia mais adequada e capaz de extrair o máximo de componentes proteicos intracelulares desses microorganismos**. A PAGE-SDS, provou ser uma técnica de valor complementar em estudos de afinidade filogenética entre as espécies de leveduras estudadas.

1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista a ocorrência cada vez maior das infecções micóticas (OTÁVIO, 1994¹⁸⁹ e OLIVEIRA & COSTA, 1994)¹⁸⁴ nos seres humanos, têm-se dado muita importância à implantação de novos serviços de Micologia em diversos hospitais do país, bem como de amplas discussões em congressos científicos nacionais e internacionais sobre o diagnóstico e tratamento dessas doenças (ZAITZ^{293, 294}, 1994 a e b ; MARQUES¹⁴⁵ *et al.*, 1996; MACAMBIRA¹³⁵ *et al.*, 1996).

Assim sendo, a busca de novos conhecimentos etiopatogênicos, clínicos, patológicos, imunológicos e terapêuticos sobre as moléstias fúngicas, têm justificado o grande interesse de pesquisas com esses microorganismos. Eles têm sido estudados sob diversos pontos de vista, como por exemplo em seus aspectos morfológicos, citológicos, comportamentos fisiológicos e patológicos, imunológicos, diagnósticos e taxonômicos, por alguns dos mais destacados nomes do campo, como AXELSEN⁹ (1973), LODDER & KREGER VAN RIJ¹³² (1984), LACAZ¹¹⁹ (1980), TASCHDJIAN²⁶¹ (1957) e muitos outros.

Sob o ponto de vista taxonômico, a avaliação resultante do conjunto de caracteres obtidos pelas provas qualitativas e quantitativas no estudo dessas leveduras, permite a seleção dos gêneros em diferentes espécies. Assim sendo, a tipagem de células é obtida através da análise do conjunto das características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, genéticas, dos tipos de reprodução, dos aspectos macro e micromorfológicos dos cultivos, das exigências nutricionais, da osmofilia, das reações com soros específicos, análise do DNA e seus respectivos tipos de bases, além de outras inúmeras técnicas utilizadas para esse fim.

As afinidades taxonômicas mais precisas entre as espécies de leveduras, em especial as do gênero *Candida*, têm sido esclarecidas pelos estudos de seus ciclos de vida, — de modo geral — tendo em vista aspectos de sua morfologia, fisiologia, bioquímica, etc, que mesmo sendo métodos mais

demorados, contribuíram, de certo modo, na identificação taxonômica desses microorganismos. A identificação e a caracterização das leveduras pelos métodos convencionais, no entanto, tem sido insuficiente, sobretudo no aspecto de sua rapidez, conhecimento das relações inter e intraespecíficas desses microorganismos, etc., o que fez com que diversos pesquisadores propusessem novas técnicas mais acuradas para a identificação das diferentes espécies do gênero, em especial a *Candida albicans*, a que determina o maior número de infecções, tanto no homem como nos animais.

Dentre as técnicas propostas para se alcançar maior rapidez no diagnóstico dessas infecções, a eletroforese, que é relativamente simples, rápida e de alto valor informativo, ao revelar as proteínas das amostras analisadas através da análise do perfil eletroforético, tem ampliado o conhecimento mais detalhado das células leveduriformes, particularmente, com ênfase na identificação e caracterização dessas espécies. Nesse sentido, os trabalhos de GALLEGLY em 1983 (cf. ALFENAS⁴ *et al.*, 1991), MOREIRA & ALFENAS¹⁶² (1985), STIPES²⁵³ (1989) e BRUNEAU & GUINET²⁶ (1989), têm apontado no uso da eletroforese — em especial as que se utilizam dos suportes de gel de poliacrilamida e do gel de amido — como uma técnica útil para definir as enzimas ou proteínas solúveis de determinados grupos de fungos, com o intuito de identificá-los.

Como a metodologia utilizada nessas técnicas, tem variado muito (VENEZIA & ROBERTSON²⁷⁹, 1974 e GREENFIELD & JONES^{79, 80}, 1981 e 1982), dependendo da natureza química das substâncias pesquisadas (proteínas, isoenzimas ou polissacarídeos) ou ainda, em relação aos tipos de meios de cultura utilizados para a extração de componentes intracelulares, etc., levando a diferentes conclusões e considerações a respeito (SHECHTER²³⁵, 1973), ou segundo sua localização (na célula ou em filtrados de cultura), se justificam estudos mais acurados pertinentes, no sentido de se compreender melhor a natureza dessas variações.

O estudo da estrutura molecular dessas substâncias, realiza-se inicialmente com a obtenção e a preparação das amostras, o que se faz

levando-se em conta a célula total, visto que no conteúdo citoplasmático predominam constituintes de natureza protéica, responsáveis pela espécie-especificidade das leveduras pesquisadas. LODDER & KREGER VAN RIJ¹³² (1984), salientam que a técnica eletroforética tem sido muito empregada no estudo das variações e diversidades genéticas das populações naturais de diversos microorganismos ao examinar suas proteínas ou enzimas. Contudo, poucos estudos têm sido feitos, ainda com células leveduriformes.

A caracterização das proteínas presentes em determinada espécie permite estabelecer as relações desta com outras pertencentes ao mesmo gênero ou a gêneros diferentes, bem como entre espécies de organismos diferentes, estabelecendo-se assim os diversos graus de afinidade inter e intra-específicos, importantes na caracterização taxonômica.

Investigações dessa natureza levadas a efeito recentemente nos laboratórios de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP (trabalho ainda não publicado) apontaram para o uso do método da criofatura celular pelo nitrogênio líquido com tampão contendo 2 - mercaptoetanol na extração de proteínas totais das células de leveduras do gênero *Candida* obtidas da cavidade oral de humanos. Tais resultados, demonstraram ser esse método de extração (em comparação com outros métodos) o mais adequado para estudos dos perfis eletroforéticos das proteínas intracelulares dessas amostras, com ênfase na identificação e caracterização dessas espécies de microorganismos.

Com base nesses pressupostos preliminares, o trabalho de pesquisa proposto, objetivou estudar a influência do meio de cultura no cultivo e extração dos componentes intracelulares de células leveduriformes isoladas da cavidade oral de humanos, analisando o perfil eletroforético desses microorganismos, através da técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS), como contribuição aos estudos de identificação e caracterização desses microorganismos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

A história dos fungos e das leveduras com certeza perde-se no tempo. Segundo SVRCEK²⁵⁶, (1994), os achados mais antigos de fungos datam do período Paleozóico (Devoniano), há aproximadamente 350 milhões de anos, muito embora pouco se saiba sobre o número de espécies que existiam naquela época. MACKENZIE, em 1925 (cf. SKINNER²⁴¹ *et al.*, 1980), relata os achados arqueológicos do antigo Egito, que demonstram serem os egípcios já conhecedores das leveduras, pois produziam vinho a partir das uvas, acondicionando-o em ânforas, há cerca de 6.000 anos atrás. DEMIATE⁵² *et al.*, (1994), reportam que a fermentação de alimentos era uma prática empregada pelo homem desde tempos imemoriais, sendo a panificação conhecida desde 7.000 A.C., tendo os padeiros romanos, participado de uma classe muito privilegiada por dominarem todo o seu processo. Textos hieroglíficos mostram os alimentos utilizados pelos faraós em seu desjejum, destacando-se aproximadamente 1.000 produtos diferentes e, dentre eles, os obtidos pela maltagem da cevada, a fermentação e a obtenção da cerveja e do pão, consumidos já em 2.700 A.C.! Existiam, ainda, 16 tipos diferentes de pães e bolos e vários tipos de cervejas para o deleite matinal de seus governantes. Para que esses povos da antigüidade conseguissem obter os produtos fermentados, estavam mesmo, talvez sem o saber, fazendo uso das leveduras e das bactérias em seus processos de obtenção. ROGERS²¹⁵ (1994), relata que também a fermentação de frutos já era conhecida desde a antigüidade, tendo os gregos atribuído a sua invenção ao deus Dionísio. Os chineses já bebiam o "kui", uma cerveja de arroz há 2.300 anos A.C. e usavam o bolor da soja para tratar de infecções cutâneas. JOLY¹⁰⁵ (1954), relata que no Gênesis, primeiro livro da Bíblia, há referência sobre o pão e o consumo de vinho, enquanto que no segundo livro, do Êxodo, refere-se sobre o uso dos pães asmos (pães sem fermento) em cerimônias religiosas. REED & NAGODAWITHANA²¹⁰ (1991), revelam que nas ruínas da cidade de Memphis,

datadas pelo carbono-14 em mais ou menos 3.000 A.C., foram encontradas cenas numa parede, representando uma padaria e o comércio de pães. Os índios da América Central exploravam as virtudes antibióticas dos cogumelos, que também representavam o símbolo da longevidade. Relata que logo após a descoberta do fogo, o ser humano primitivo passou a cozer alimentos e a fermentar os sucos dos vegetais.

BROTHWELL²⁴ (1992), revela que entre os achados microbiológicos do "Bog Man" (ser humano primitivo perfeitamente conservado no lodo), descoberto em Cheshire, Inglaterra, em 1984, destacavam-se vários fungos e leveduras, dentre elas espécies do gênero *Candida*. Também segundo HASELWANDTER & EBNER⁸⁶ (1994), foram encontrados fungos nas botas do "Homem do gelo", encontrado nas montanhas do Tirol em setembro de 1991, e que havia morrido à cerca de 5.300 anos. Dois pesquisadores da Universidade de Innsbruck, na Áustria, examinaram as amostras de feno que ele havia usado para isolar suas botas do frio, e descobriram fungos microscópicos das espécies *Absidia corumbifera* e *Chaetomium globosum*. O mais impressionante, é que esses fungos voltaram à vida quando foram colocados junto a nutrientes específicos. Mais recentemente, verificaram que ele pode ter morrido em virtude de uma infecção causada pela presença de fungos em seus pulmões, tendo-se levado para a Califórnia, amostras do tecido pulmonar para análise genética e dos fungos encontrados.

CHAMBERLAIN³⁷ (1994), FILER⁶⁷ (1995) e TAYLOR²⁶² (1995), reportaram em diversas publicações sobre estudos de múmias e restos de seres humanos mumificados, as diversas doenças que os mesmos padeceram em vida e aquelas que os levaram à morte, incluindo-se aí as provocadas por diversos fungos. Em todas as partes do mundo, achados semelhantes em múmias foram feitos, destacando o papel de alguns desses microorganismos na flora e nas doenças desses seres primitivos.

THORWALD²⁶⁴ (1990), relata os achados do Papiro de Ebers, descoberto por George Ebers em 1873, narrando em escrita hierática os conhecimentos médicos dos antigos egípcios e as receitas de inúmeros medicamentos e procedimentos utilizados por eles para o tratamento de um

grande número de enfermidades. Aliado aos achados do Papiro de Smith (Edwin Smith, de 1862) esses conhecimentos trouxeram à luz informações importantes à cerca do uso que os antigos egípcios faziam de materiais fermentados, como a mistura de fezes ressequidas reduzidas a pó, com o mel fermentado, para o tratamento de infecções oftálmicas. Além disso, faziam uso de lodo e terra para compressas, da “borra da cerveja” em casos de distúrbios intestinais e abscessos da pele e, ainda, pão embolorado para afecções da bexiga e feridas purulentas. Relate-se, ainda, as observações que fizeram, ao mostrar que o odor da urina de alguns doentes era semelhante ao do pão fermentado.

Deixando-se de lado os absurdos que alguns desses tratamentos hoje demonstram, vários pesquisadores citados por THORWALD²⁶⁴, provaram o valor que o uso da “farmácia de sujeiras” possuía, ao demonstrarem que as terras e lodos usados, escondiam fungos em seu interior, produtores que são, de inúmeros agentes antibacterianos e que, portanto, eram capazes de destruir as bactérias patogênicas, ou ainda impedir o seu desenvolvimento nos locais onde eram aplicados. O uso da “borra de cerveja” ou “lodo da cerveja”, demonstrou-se também útil para muitos doentes, pois possui inúmeras vitaminas do complexo B.

Muito embora nenhum outro povo da antiguidade, como os egípcios, tenha desenvolvido tanto e introduzido o uso de produtos fermentados na alimentação e no tratamento de algumas doenças, ULLOA & KURTZMANN, em 1975 (cf. THORWALD²⁶⁴, 1990), relatam a utilização de produtos obtidos da fermentação do milho por tribos primitivas das áreas remotas da América Central e do Sul, como, por exemplo, o “pozol” (uma massa onde se misturavam água, substâncias aromáticas e produtos da fermentação do milho), além da confecção de pães e bolos, nos quais a ação de leveduras e bactérias era parte vital do processo. ROGERS²¹⁵ (1994), revela ainda que também ocorria a fermentação em meios líquidos, na produção do iogurte e do molho de soja, descrito no século VII na China e no Japão. Também o “ogi”, um biscoito fermentado produzido na África a partir da fécula de milho, sorgo ou painço, é exemplo de outros produtos obtidos através de métodos

artesanais por culturas primitivas. Vários países do Sudeste asiático fazem há séculos, fermentações de produtos sólidos e líquidos para produzir molhos de soja (tempeh) ou de mandioca (gari). REED & NAGODAWITHANA²¹⁰ (1992), relatam, ainda, que data do ano de 1383 D.C. a fundação de uma cervejaria em Munique, na Alemanha (pelo menos aquela que apresenta todos os documentos bem registrados).

Relata-nos, ainda, EVANGELISTA⁶³ (1989), que cepas de *Sacharomyces* apresentam mais de 10% do seu peso seco em ergosterol, que por processo químico ou irradiação, origina o calciferol (vitamina D2). Além disso, fungos como o *Botrytis cinerea*, que provoca a "podridão nobre" das uvas da região de Bordeaux, na França, concentra bastante o açúcar, a pectina, a glicerina e outras substâncias da uva, gerando um vinho adocicado de inimitável "flavor" e, sem dúvida, extraordinário: o "Sauternes". DEMIATE⁵² *et al.* (1994), fazem uma excelente revisão sobre os produtos fermentados utilizados pelos seres humanos das mais diversas culturas e regiões da terra, desde os tempos mais primitivos até os dias de hoje.

ULLOA & KURTZMANN (cf. THORWALD²⁶⁴, 1990), revelam ainda que apesar de serem importantes nesses processos, tinha-se o conhecimento que em certos casos, havia o aparecimento de doenças oriundas do processamento inadequado dessa "fermentação", o que se sabe hoje, serem resultantes de contaminações com outras leveduras, como por exemplo algumas espécies do Gênero *Candida*, destacando-se a *C. parapsilosis* e a *C. tropicalis*, sendo esta última responsável por estragar os alimentos e as bebidas.

WISTREICH & LECHTMAN²⁹⁰ (1980), relatam que as leveduras já haviam sido observadas por Leeuwenhoek desde o ano de 1674, muito embora por essa época muito pouco se conhecesse a respeito das fermentações, processo tido como não vital, até que entre 1839 e 1869 Berzelius, Liebig & Wöhler chamassem de "fermentos" as entidades químicas responsáveis pelo seu desenvolvimento. As leveduras eram consideradas somente produtos secundários dessas reações. Foi somente nos anos 1836-1837, que Kützing (algologista alemão), Cagnaird-Latour (físico francês) e

Schwann (fisiologista e patologista alemão), lançaram as bases da teoria biológica da fermentação, demonstrando, por exemplo, o papel das leveduras na fermentação, produzindo álcool e gás carbônico a partir da glicose, necessitando de nitrogênio para crescer e, reproduzindo-se de maneira assexuada (brotamento). Também foi verificado que sem a presença das leveduras, o processo fermentativo não ocorria, como nos informou BURNETT³⁰ *et al.* (1978). Ainda segundo DEMIATE⁵² (1994), também houve a contribuição dos trabalhos de Gay-Lussac que, em 1810, formulou a equação da fermentação alcoólica.

Coube, contudo, aos pioneiros trabalhos de Pasteur, em 1857 e em 1863, e de Kock em 1876, demonstrarem a relação causal de certos fungos com o processo fermentativo e com o aparecimento de doenças no ser humano e em animais, conforme o que foi descrito por BURROWS³¹ *et al.* em 1968 e por DEMIATE⁵² *et al.* (1994). Descrevem esses autores também, os estudos realizados por Schoenlein & Gruby em 1839, que resultaram na descoberta do agente causal do favo do couro cabeludo e, no mesmo ano, da descoberta por Lagenbeck da *Candida albicans*, causadora de inúmeras micoses oportunistas. Para Ainsworth (1986), o fundador da micologia médica foi o médico húngaro David Gruby (1810-1898), que estudou o "sapinho" e as tinhas, dentre outras micoses. Os fungos foram, portanto, os primeiros microorganismos a terem a sua patogenicidade demonstrada.

LACAZ¹²¹ *et al.* (1991), relatam que o termo "micose" foi utilizado pela primeira vez por VIRCHOW, em 1856, ao realizar estudos com os fungos patogênicos. Estes mesmos autores, descrevem inúmeras contribuições à história da micologia, realizadas por dezenas de pesquisadores, que descobriram os agentes causais de inúmeras doenças provocadas por fungos e leveduras, durante os séculos XIX e XX, destacando-se nomes como os de Bassi (1773-1856), Saccardo (1845-1920), Sabouraud (1864-1938), Langeron (1874-1950) e diversos outros. Entre nós, foram importantíssimas as contribuições de Fonseca Filho (1895-1978), Paulo de Almeida (1896-1977), Jorge Lobo, Adolpho Lutz, Splendore e muitos outros.

O quadro nº 1 a seguir resume os principais aspectos da evolução histórica a respeito das leveduras:

Quadro 1. Principais aspectos da evolução histórica a respeito das leveduras

Período Pré-científico	
3000 A.C.	- nas ruínas da cidade de Memphis são encontradas cenas representando uma padaria.
1383 D.C.	- fundação de uma cervejaria em Munique, na Alemanha.
1680 D.C.	- Leeuwenhoek observa uma levedura no microscópio.
1753/58 D.C.	- Linné propõe o sistema de nomenclatura binominal e introduz a sistemática de plantas e animais.
1810 D.C.	- Gay-Lussac formula a equação da fermentação alcoólica.
Período de Surgimento da Enzimologia e da Microbiologia	
1822/32	- Pereson e Fries avançam a classificação dos fungos; as leveduras são reconhecidas como fungos.
1825/39	- Schwann e Kützing de la Tour descrevem o brotamento e a formação de esporos pelas leveduras.
1838	- Meyer dá nome à levedura da cerveja (<i>Sacharomyces cerevisiae</i>).
1857/63	- Pasteur prova a origem microbiana da fermentação, explicando-a ser de natureza anaeróbica.
1866	- de Bary observou o ciclo de vida das leveduras.
1870	- Reess observou os ascósporos das leveduras e a sua germinação; redefiniu o gênero <i>Sacharomyces</i> .
1881/83	- Hansen começou os estudos com culturas puras e o isolamento de células únicas de leveduras de padaria.
1888	- Marx advogou o uso de culturas de leveduras puras para a obtenção do vinho.
1896	- Hansen publicou uma abrangente classificação científica sistemática das leveduras.
Período Moderno	
1920/28	- Guilliermond expandiu o método de Hansen para a classificação das leveduras.
1931/52	- Stelling-Dekker, Lodder, Diddens e Kreger Van Rij deram um pouco mais de unidade e ordem à taxonomia das leveduras.
1934	- Winge e Satava descobriram as alterações de fase (haplóide e diplóide) na levedura do pão.
1943	- Lindegren descobriu heterotalismo na levedura do pão.
1944	- O elétron microscópio é utilizado.
1951	- Wickerham usa novas técnicas para caracterizar as leveduras.
1952	- Publicação da 1ª edição do livro <i>The Yeasts</i> de Lodder e Kreger Van Rij.
1970	- Os mesmos autores e outros cientistas revisam a classificação das leveduras.
1978	- Os experimentos com homologia do DNA-DNA feitos por Price e cols. é usado para a delimitação das espécies.
1984	- Kreger Van Rij e outros cientistas revisam mais uma vez a classificação das leveduras.

Fonte: Reed e Nagodawithana (1991)

2.2. Ecologia

As leveduras e outros bolores, especialmente as leveduras do gênero *Candida*, têm sido encontradas amplamente distribuídas na natureza. Destaque-se por exemplo, sua presença no ar atmosférico (MENDES¹⁵⁰, 1989; PURCHIO²⁰² et al., 1984; GAMBALE⁷¹ et al., 1977; GAMBALE⁷² et al., 1981; MONTEIRO & SEIXAS¹⁵⁹, 1993) no ar atmosférico de cidades como Ribeirão Preto (BUCK²⁷ et al., 1985), e Araraquara (REDNER²⁰⁹, 1964); na água do mar (BOOTH²¹, 1979), no mar Mediterrâneo (MATES¹⁴⁶, 1994); em águas poluídas (HAGLER^{81, 82, 83} et al., 1979; PURCHIO²⁰² et al., 1988); no solo (SPENCER & GORIN²⁴⁸, 1971; NINOMIYA¹⁷² et al., 1993) e no solo do município de Piracicaba (MORAES¹⁶¹, 1965), destacando-se o de canaviais, chiqueiros e currais.

Relatam-se ainda o seu aparecimento em pássaros, mamíferos silvestres e domésticos e na vegetação (JOLY¹⁰⁵, 1954; ODDS¹⁷⁹, 1984; MIDDELHOVEN¹⁵⁴, 1990), além de inúmeros produtos de uso diário e alimentares, como carnes e carnes de rã (NOGUEIRA¹⁷⁶ et al., 1992), macarrões (CORTINEZ⁴⁴ et al., 1988), sucos de frutas morangos fermentados (SUZUKI²⁵⁵ et al., 1991) e vinhaça e melaço (TANK & GAMBALE²⁵⁹, 1982). CARLOTTI³⁴ et al. (1991), relatam que cepas do gênero *Candida* participam na obtenção do queijo suíço Emmental. As leveduras têm sido descobertas inclusive em locais exóticos, como, por exemplo, em amostras de água retiradas do mar a 60 milhas do Pólo Norte (KRISS, 1955, cf. VAN UDDEN²⁷⁵, 1960).

Outros autores, entretanto, citam a presença dessas leveduras em ambientes de trabalho e hospitais (CUCÉ⁴⁵ et al., 1993 e ALMEIDA⁷ et al., 1988), preocupando-se em estudar os eventuais focos de possíveis infecções humanas ou, ainda, de reservatórios e portadores sãos (ODDS¹⁷⁸, 1979). PHAFF & STANNER (cf. SKINNER²⁴¹ et al., 1980), salientam que as espécies do gênero *Candida* não possuem afinidade por nenhum ambiente, excetuando-se a espécie *albicans*, que em alguns casos, prefere o tecido animal.

Muito embora essas leveduras possam ser encontradas em vários locais do corpo humano, como a boca, ânus, vagina, pele e até na urina de pessoas saudáveis (ODDS¹⁷⁸, 1979 e STAIB, cf. SKINNER²⁴¹ *et al.*, 1980), numerosos estudos indicaram que os diversos biotipos isolados de locais anatômicos diferentes, em 327 indivíduos, apresentam sempre os mesmos padrões. Digno de nota é o fato de que os biotipos associados com os sintomas clínicos de candidose genital, são os mesmos dos achados em cepas comensais dessas regiões, o que reforça a teoria dos que consideram essas leveduras como oportunistas, requerendo, portanto, alterações nas defesas do hospedeiro para provocarem infecções. As rotas de transmissão, segundo esses autores, parecem ser da pele e unhas para o parceiro sexual; da genitália para o parceiro sexual ou para o recém-nascido; dos intestinos para a genitália ou para o sangue e, do beijo materno para o recém-nascido.

SHEPHERD²³⁷ *et al.*, em 1985 e LACAZ¹¹⁹ (1980), ressaltaram a grande importância da associação da espécie *albicans* aos seres humanos e outros animais homeotermos, habitando normalmente a orofaringe, cavidade bucal e peribucal, dobras da pele, vagina, urina, fezes e secreções como a brônquica.

Diversos estudos realizados em animais, como os de SMITH²⁴², em 1967; MEYER & ORDAL¹⁵², em 1946; HASENCLEVER & KOGAN⁸⁷ (1975) e VAN UDDEN²⁷⁵ (1960), relataram a presença dessas leveduras sobretudo no trato gastrointestinal, vivendo comensalmente com seus hospedeiros. Também autores como FADER⁶⁴ *et al.* (1985), ROGERS & BALISH²¹⁶ (1976), KENNEDY & VOLZ¹¹⁴ (1983), DROUHET & SIMONNET⁵⁶ (1957), JORGE¹⁰⁸ *et al.*, (1993) e, muitos outros, estabeleceram valiosos estudos experimentais com essas leveduras em animais, contribuindo para a compreensão de sua ecologia, comportamento e patogenicidade, que podem ser extrapolados e melhor elucidar as similaridades com o ser humano, resguardadas as diferenciações inter e intra-específicas.

A literatura médica é extremamente extensa no que diz respeito a infecções fúngicas em seres humanos, tendo-se observado nos últimos 30

anos, a existência de centenas de trabalhos científicos, sendo vários de revisões de diversos casos. Nota-se, contudo, que nos últimos 5 anos, tem havido um grande aumento na incidência de infecções fúngicas em pacientes aidéticos (EDELWEISS⁶⁰ *et al.*, 1995), usuários de nutrição parental total (POPPO²⁰⁰ *et al.*, 1994), desnutridos (DELGADO⁵¹ *et al.*, 1995), imunodeprimidos (CORNACCHIONI⁴² *et al.*, 1996) e micoses de contaminações hospitalares em pacientes internados (RAMOS FILHO²⁰⁷ *et al.*, 1996).

Também estão sendo reportados, casos clínicos de candidíases raras, como as que atingem as meninges (SARMIENTO²²⁴ *et al.*, 1994 e GERMAIN⁷⁵ *et al.*, 1994), membranas vitelínicas (MAGALHÃES NETO & FONTES¹³⁹, 1995) ou as que formam microabscessos hepáticos.

Outros autores, como SETTO²³³ (1995) e RANGEL-FRAUSTO²⁰⁸ *et al.* (1994), têm reportado o aumento das micoses sobretudo no verão e em certas regiões do corpo (mãos) de trabalhadores da área da saúde, além das superfícies inanimadas dos objetos, o que pode indicar um aumento na sua eventual transmissão.

ESTEVES⁶² *et al.* (1977), relacionam no quadro a seguir os principais fatores relacionados com a candidose no ser humano:

Quadro 2. Fatores relacionados com a candidíase

— Fisiológicos	- idade (recém-nascido) - gravidez
— Climáticos	- calor - umidade
— Endócrinos	- Diabetes - hipotireoidismo - hipoparatiroidismo - doença de Addison - pancreatite
— Metabólicos	- obesidade - carências alimentares - desnutrição - síndromes de má absorção
— Imunitários	- defeitos de natureza constitucional (displasia tímica); - imunossupressão por doença ou por ação terapêutica;
— Medicação farmacológica	- antibióticos - quimioterápicos - anticoncepcionais por via oral - corticosteróides - antimetabólicos citotóxicos
— Doenças crônicas	- consumptivas - alcoolismo
— Doenças malignas	- leucemias - linfomas - neoplasias
— Doenças hemáticas	- anemia - agranulocitose
— Estados pós-operatórios	
— Malformações	
— Ação traumática tegumentar	- maceração da pele - dermatites - irritação das mucosas
— Atividade sexual	

Fonte: ESTEVES et. al. (1977)

LYNCH¹³⁴ (1994) revela que a candidíase oral foi reconhecida como entidade clínica própria já no tempo de Hipócrates que a descreveu em associação com severa queda de resistência no século IV A.C. A primeira pesquisa bem fundamentada sobre a candidíase oral, foi feita na França, pela Sociedade Real de Medicina em 1786 e, em 1839, Langenbeck demonstra o agente causal (*C. albicans*) na mucosa oral de um paciente com tifo. Desde que David Gruby estudou os "sapinhos", por volta de 1839, determinando a patogenicidade das leveduras, os primeiros agentes patogênicos descobertos, os diversos profissionais da área da saúde, dentre eles os médicos e os dentistas, têm se dedicado ao estudo dessas micoses. CHARIFKER³⁸ (1960), em sua tese de livre-docência, salientou que as leveduras contaminam a região oral ao serem introduzidas na boca, oriundas do meio exterior, com os alimentos, água, ar, ou ainda, através do contato com superfícies corporais ou inanimadas contaminadas.

Inúmeras contribuições no campo da micologia oral têm sido oferecidas por diversos pesquisadores, destacando-se os trabalhos de LIGHTERMAN¹²⁷ em 1951, que reportou um caso de monilíase oral que se disseminou em decorrência de complicação terapêutica em paciente que havia removido um cisto maxilar na clínica dental. PASSOS¹⁹³ (1961) e BERTOLINI¹³ (1964), demonstraram também a prevalência desses microorganismos em processos carióticos micóticos ou em amostras de canais radiculares humanos. Outros ainda, como BARTELS & BLECHMAN¹¹ (1962), chamaram a atenção para a frequência e distribuição dessas leveduras na cavidade oral de indivíduos normais, ou de usuários de próteses dentárias (DAVENPORT⁴⁸, 1970). RUSSEL & LAY²¹⁹ (1973), estudaram a história natural das leveduras e espécies do gênero *Candida* na cavidade oral de crianças, desde o dia do nascimento até o primeiro ano de vida. Verificaram que elas estavam presentes de 5,7% a 14,2% nos recém-nascidos e que aumentavam para até 82% nas 4 primeiras semanas de vida, principalmente quando as crianças iam para suas casas. A dieta do hospedeiro, bem como mecanismos de aderência e outros fatores predisponentes do próprio hospedeiro, têm sido apontados

como os fatores de maior importância na manutenção de uma flora fúngica oral. STENDERUP²⁵¹ (1990) relata que as leveduras são encontradas na cavidade oral de indivíduos normais em 60 a 70% dos casos, sendo as espécies *albicans*, *glabrata* e *tropicalis* as mais comuns. Todavia, LYNCH¹³⁴ (1994) salienta que o termo "portador" é muito discutido na literatura, em contraste com o "doente", havendo casos estatísticos que favorecem os dois lados. O transporte das leveduras é muito influenciado pela idade, tendo crianças com 1 a 18 semanas, taxas de mais de 50%, em contraste com 20% para os adultos. Outros autores atribuem esse fato a diferenças imunológicas (CHALLACOMBE³⁶, 1994).

OLIVER & SHILLITOE¹⁸⁶ (1984) e MANDEL¹⁴⁴ (1994), estudaram os efeitos do fumo (tabaco) na prevalência e distribuição intraoral dessas leveduras e DARLING⁴⁶ *et al.* (1990), os efeitos do uso da maconha sobre a flora oral. Nesses casos, constatou-se um aumento na incidência e densidade das leveduras do gênero *Candida*, em especial da *C. albicans*, nesses indivíduos.

A candidíase oral é a infecção fúngica mais comum da cavidade oral (ALLEN⁵, 1992) e tem aparecido em incidência cada vez maior em pacientes com câncer da cavidade oral (PAULA¹⁹⁴ *et al.*, 1990), em pacientes imunocomprometidos e com doenças graves (HEIMDAHL & NORD⁹², 1990), em idosos, (WILKIESON²⁸⁶ *et al.*, 1991 e ELIASSON⁶¹ *et al.*, 1992) em diabéticos (DARWAZEH⁴⁷ *et al.*, 1991 e QUERINO²⁰⁴ *et al.*, 1994), e nos últimos anos, em pacientes aidéticos (SCHMIDT-WESTHAUSEN²²⁶ *et al.*, 1991; DUFFLY⁵⁷ *et al.*, 1992; SCULLY & ALMEIDA²³¹, 1992); SAMARANAYAKE²²², 1992; FELIX & WRAY⁶⁶, 1993; MONIACI¹⁵⁷ *et al.*, 1993; KOLOKOTRONIS¹¹⁶ *et al.*, 1994; REICHART²¹¹ *et al.*, 1994; VALDEZ²⁷² *et al.*, 1995; HIRATA⁹⁵ *et al.*, 1996).

Desde o excelente estudo sobre a microbiota normal do homem, realizado por SOCRANSKY & MANGANIELLO²⁴⁵ (1971), até os trabalhos de DREIZEN⁵⁵ (1984), STENDERUP²⁵¹ (1990), BUDTZ-JÖRGENSEN (1990), OLSEN^{187,188} (1990), PARK & YACCOB¹⁹² (1994), PORTER & SCULLY²⁰¹

(1994), os pesquisadores têm verificado o papel dessas leveduras nas mais importantes infecções micóticas da cavidade oral, destacando-se o "sapinho" e, avaliando-se as alterações locais e/ou sistêmicas em indivíduos imunodeprimidos, aidéticos, usuários de drogas e medicamentos antibacterianos por tempos prolongados ou, portadores de doenças malignas e hábitos do fumo. Salientam que os eventos biológicos locais, comuns em infecções endodônticas e outras condições, decorrentes do uso de próteses parciais, presença de cáries, doença periodontal, erupção e esfoliação dos dentes, também podem predispor à candidíase.

BUDTZ-JÖRGENSEN^{28,29} (1990), reporta os fatores que predis põem à candidose oral, que podem ser sistêmicos ou locais, segundo o quadro abaixo:

Quadro 3. Fatores que predis põem à candidose oral

Fatores sistêmicos:

- fisiológicos: idade avançada; infância; gravidez;
- desordens endócrinas: diabetes mellitus; hipotireoidismo;
- deficiências nutricionais de: ferro; folatos; vitamina B12;
- doenças malignas: leucemia aguda; agranulocitose;
- defeitos imunes ou imunossupressão: AIDS; aplasia tímica; corticosteróides;

Fatores locais:

- xerostomia;
- síndrome de Sjörgren; irradiação; quimioterapia;
- antibióticos de largo espectro;
- corticosteróides;
- dieta rica em carboidratos;
- leucoplaquia; câncer oral;
- mudanças nas condições de desenvolvimento: dentaduras; traumas; falta de higiene em dentaduras e próteses;
- fumar tabaco

Fonte: BUDTZ-JÖRGENSEN (1990).

HOLMSTRUP & AXELL⁹⁷ (1990), classificaram as manifestações clínicas das infecções orais por leveduras, de acordo com o quadro abaixo:

Quadro 4. Classificação das candidoses orais:**Tipos agudos:**

- pseudomembranosa;
- eritematosa;

Tipos crônicos:

- pseudomembranosa;
- eritematosa;
- semelhante a placa;
- nodular;

Lesões associadas à *Candida*:

- queilite angular; (perlèche)
- estomatite das dentaduras;
- glossite mediana rombóide;

Fonte: HOLMSTRUP & AXELL (1990).

OKSALA¹⁸³ (1990) ao reportar os fatores que predispõem à infecção oral por leveduras, salienta que deve-se procurar avaliar com maior segurança as condições de saúde do paciente e, nesse sentido recomenda os seguintes testes para se identificar essas desordens; segundo o quadro abaixo:

Quadro 5. Testes para identificar desordens das infecções leveduriformes

Exames de sangue e de urina de rotina	Testes para verificar a função endócrina	Testes para verificar as anormalidades glandulares	Testes para verificar a função imune
- hemograma completo - ferro sérico - capacidade de ligação do ferro - proteínas - vitamina B12 - folatos - piridoxina - teste dextrostix	- proteína ligadora de iodo - avaliação do açúcar sangüíneo - cálcio e fosfatos do soro - fosfatase alcalina - teste synacthen	- % de fluxo das parótidas - biópsia da glândula labial - sialografia - anticorpos contra os ductos salivares - fator reumatóide - fator antinúcleo	- imunidade humoral local - imunoglobulinas e anticorpos salivares anti-<i>Candida</i> - imunoglobulinas séricas - anticorpos do soro anti-<i>Candida</i> - imunidade mediada por células - skin teste - transformação dos linfócitos (PHA) - produção de linfocinas (MIF) - testes de função dos neutrófilos: mieloperoxidase, nitroazultetrazólio

Fonte: OKSALA (1990).

Para o diagnóstico da candidose oral, BUDTZ-JÖRGENSEN^{28,29} (1990) recomenda os seguintes procedimentos técnicos:

Quadro 6. Procedimentos técnicos para o diagnóstico da candidose oral

Patologia	cultura	esfregaço	biópsia	sorologia	CMI	hematologia
candidose pseudomembranosa aguda	+	+	-	-	-	-
candidose atrófica aguda	+	+	-	-	-	-
candidose pseudomembranosa crônica	+	+	-	+	+	+
candidose hiperplásica crônica	+	+	+	-	-	-
candidose mucocutânea crônica	+	+	+	-	+	-
estomatite por dentadura	+	+	-	-	-	(+)
queilite angular	+	+	-	-	-	(+)

+ = útil

- = inapropriado

(+) = pode ser útil

CMI = imunidade mediada por células

Sob hematologia podem ser úteis os testes de ferro plasmático e vitaminas do complexo B.

CHALLACOMBE³⁶ (1994) reporta a importância do estudo dos aspectos imunológicos dos pacientes com candidose oral. A imunidade contra essas infecções é bastante complexa e parece variar de acordo com os diferentes tipos de agentes causais envolvidos com as interações entre a mucosa oral e o sistema imune, e com os diferentes tipos clínicos da doença.

Dentre os fatores possivelmente envolvidos na proteção contra essas infecções estão:

Quadro 7. Fatores possivelmente envolvidos na proteção contra as infecções por leveduras do gênero *Candida*

FATOR	POSSÍVEL MECANISMO
Imunidade específica	
anticorpos séricos	opsonização; inibição do crescimento
anticorpos salivares	opsonização; inibição do crescimento
Imunidade mediada por Células	
ativação das células citotóxicas	inibição da aderência ativação dos macrófagos e polimorfonucleares citotoxicidade direta
Imunidade não específica	
opsonização	aumento de anticorpos
fagocitose	ter a possibilidade de matar
ativação do complemento	interação com células
ativação de macrófagos	ter a possibilidade de matar
proteínas antifúngicas como as calprotectinas e as histatinas	inibição do crescimento

2.3. Caracteres gerais

Dentre todos os seres vivos, os fungos fazem parte de um Reino próprio: o Reino *Mycetae* ou *Fungi*.

Os fungos e cogumelos fazem parte dos Mycobionta, com aproximadamente 100.000 espécies, apresentando núcleos (eucariontes) mas não plastídeos (heterotróficos). Produzem esporos e corpos de frutificação, onde aparecem pigmentos como o caroteno, melanina e outros compostos cíclicos, tendo como substâncias de reserva o glicogênio e lipídeos. A membrana celular é rígida e constituída de quitina, celulose, ou ambas, sendo o corpo vegetativo formado de filamentos ramificados (raramente não ramificados), com crescimento apical e chamados de hifas. Quando se agrupam, as hifas formam os micélios. Vivem em todos os climas da Terra e necessitam de compostos de carbono, nitrogênio, enxôfre, fósforo e íons metálicos, além de temperaturas entre -10°C e $+60^{\circ}\text{C}$, umidade, e pH situado

entre 3,5 e 6,5. As quantidades de luz, CO₂ e O₂ podem influenciar a formação de esporos, dos corpos de frutificação e da multiplicação vegetativa. São saprófitas e parasitas obrigatórios ou facultativos.

COOPER (cf. LENNETTE¹²⁶ *et al.*, 1987), recorda que eles se diferenciam das bactérias pelo fato de apresentarem paredes celulares formadas lentamente e compostas de polímeros de polissacarídeos como a glucana, manana, celulose e quitina. Não existem nos fungos os ácidos teicóico e murâmico, da parede celular das bactérias. LENNETTE¹²⁶ (1987), reporta que sob muitos aspectos, eles são menos complicados do que as bactérias, pois crescem mais lentamente que elas. SVRCEK²⁵⁶ (1994) salienta ainda que os fungos apresentam muitas características semelhantes aos vegetais, o que fez com que tivessem sido classificados entre eles. Cita o fato de não possuírem clorofila, não estando aptos a produzir substâncias orgânicas complexas como açúcares, amido e gorduras, comportando-se então, como heterotróficos. São, todavia, mais amplamente distribuídos na natureza do que as plantas verdes.

Os fungos apresentam características morfológicas muito particulares, o que faz com que às vezes, possam ser prontamente reconhecidos. Em termos gerais (NEDER,¹⁶⁷ 1968), apresentam-se formando filamentos ou hifas, ou então, formando estruturas leveduriformes ("células" ovaladas). As hifas, por sua vez, podem ser septadas ou não (cenocíticas). O conjunto ou reunião de hifas forma o micélio, que quando possui as estruturas de reprodução do fungo, é chamado de reprodutivo ou aéreo e, quando penetra no meio de cultura para retirar os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, de vegetativo.

Característica importante dos fungos filamentosos é a sua capacidade de formar esporos haplóides, que dependendo do formato das estruturas que os contêm, podem ser esporangiósporos, zoósporos, conídios ou artrósporos; ou ainda esporos diplóides, como os zigósporos, ascósporos e basidiósporos.

Além dos fungos filamentosos, existem as leveduras, cujo estudo, interessa-nos mais amiúde visto serem importantes agentes patogênicos aos seres vivos. Contudo, desconhece-se o índice de prevalência das infecções por leveduras em todo o mundo.

CAMARGO (cf. ALMEIDA⁷ *et al.*, 1960), recorda que o termo levedura vem do latim *levare* que significa levantar. Daí as variações "lieviti" (italiano), "levure" (francês), "levadura" (espanhol); "yeast" (inglês), "gist" (holandês) e "hefe" (alemão), que significam espuma, agitação violenta, levantar e erguer.

A primeira publicação do livro "The Yeasts", de Kreger Van Rij, em 1952, trazia 164 espécies de leveduras em 26 gêneros diferentes (REED & NAGODAWITHANA,²¹⁰ 1991). A publicação de 1970, já possuía 349 espécies e 39 gêneros, enquanto que a de 1984, 500 espécies em 60 gêneros.

De acordo com LODDER & KREGER VAN RIJ¹³² (1984), as leveduras podem ser definidas como fungos unicelulares que se reproduzem por brotamento ou fissão. Formam dessa maneira, os pseudomicélios, que podem vir a formar os clamidósporos e, se as condições do meio o permitirem, os blastósporos isolados. Em virtude da formação de esporos, são divididas em 3 famílias: *Endomycetaceae*, *Sporobolomycetaceae* e *Cryptococcaceae*.

Todos os membros da família *Cryptococcaceae* apresentam células leveduriformes que se reproduzem por brotamento e formando, algumas vezes, pseudo-micélios, micélios verdadeiros e artrósporos.

A família *Cryptococcaceae* apresenta 7 gêneros (RIPPON, cf. BURROWS³¹ *et al.*, 1968), dos quais um dos mais importantes sob o ponto de vista clínico, é o gênero *Candida*, que possui 8 grupos e aproximadamente 200 espécies. As características das leveduras do gênero incluem a reprodução por meio de blastósporos formando pseudomicélios ou micélios verdadeiros, reação de urease negativa e a não formação de cápsulas ou pigmentos carotenóides. Neste trabalho, a *C. guilliermondii* pertence ao grupo VI, a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e a *tropicalis* ao grupo VII e a *C. krusei* ao grupo VIII.

Dessas quase 200 espécies de *Candida* reportar-se-ão a seguir somente as características das espécies estudadas neste trabalho.

***Candida albicans* (ROBIN) BERKHOUT, 1923:**

Tida como a espécie mais patogênica do gênero ao ser humano, apresenta uma sinonímia bastante vasta na literatura, com 172 designações diferentes citadas por ESTEVES⁶² et al. (1977).

A levedura cresce em meio líquido formando células globosas com ou sem brotamento e sedimento ou anel no tubo. Em meio sólido apresentam colônias cremosas, brilhantes e amolecidas, podendo formar borda de aspecto micelial. A cultura em ágar fubá apresenta pseudomicélios ou micélios verdadeiros e eventualmente clamidósporos. Em soro incubado a 37°C formam tubos germinativos. É rafinose (-).

***Candida tropicalis* (CASTELLANI) BERKHOUT, 1923:**

Também apresenta vasta sinonímia, com 58 citações diferentes. É a segunda levedura mais patogênica para o ser humano, sendo mais importante em infecções de pacientes com granulocitopenia (GELFAND,⁷⁴ 1989).

De crescimento semelhante ao da *C. albicans*, diferenciam-se dela por formação eventual de flocos no tubo do meio líquido e colônias esbranquiçadas e acinzentadas em meio sólido, com evidente borda micelial. Não forma clamidósporos. É rafinose (-).

***Candida krusei* (CASTELLANI) BERKHOUT, 1923:**

Apresenta 27 citações de sinônimos na literatura. Em meio líquido pode formar uma película ondulada, encrespada e seca. Em meio sólido, forma colônias esbranquiçadas com margens irregulares ou enrugadas e exibindo pseudomicélios com franjas. Não forma clamidósporos. É manitol (+) ou (-) e rafinose (-).

***Candida parapsilosis* (ASHFORD) LANGERON et TALICE, 1932:**

São citados 11 sinônimos na literatura. É comum na pele e na boca, sendo associada a casos de fungemia e endocardite em usuários de drogas (AHEARN,² 1978).

O crescimento em meio líquido é semelhante aos demais, com formação de sedimento e eventual anel. Em meio sólido forma colônias creme a amareladas, brilhantes e em algumas cepas, enrugadas. Não forma clamidósporos. É rafinose (-).

***Candida guilliermondii* (CASTELLANI) LANGERON et GUERRA, 1938:**

Possue 24 sinônimos citados na literatura.

Em meio líquido pode formar anéis e ilhotas. Em meio sólido forma colônias cremosas e amareladas, brilhantes e polidas ou onduladas. Não forma clamidósporos. É rafinose (+).

O quadro a seguir, mostra as características morfológicas, de crescimento a 37°C em soro e em meios de cultura, formação de clamidósporos e filamentação, o auxanograma do Carbono e do azoto de leveduras do gênero *Candida*.

Quadro 8. Identificação Rápida de leveduras do gênero *Candida* (Segundo E. Drouhet)

Espécies	Resposta em 4 horas			Resposta em 24 horas									
	Soro + Leveduras		Meios	Auxanograma									
	37°C (filamen- tação =+)	Sabouraud + Actidione® BCB (clamidospo- ros = +)		crescimento (inibição = 0)	Sabouraud + tetrazólio	do carbono				do azoto			
						g l i c o s e	m a l c o s e	s a a c a r c n s e e	g r a f i n t o s e	n s a i l ô n f n t o o d e	s u m ô n i		
<i>C. albicans</i>	+	+	+	branco	+	+	0	+	+	0	0	+	
<i>C. stellatoidea</i>	±	0	+	cor-de-rosa	+	+	0	0	+	0	0	+	
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	vermelho- violáceo	+	+	0	+	+	0	0	+	
<i>C. pseudotropicalis</i>	0	0	+	vermelho	+	0	+	+	+	+	0	+	
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	+		+	+	0	+	+	+	0	+	
<i>C. krusei</i>	0	0	0	branco	+	0	0	0	0	0	0	+	
<i>C. parakrusei</i>	0	0	0	rosa- avermelhado	+	+	0	+	+	0	0	+	
<i>C. zeylanoides</i>	0	0	+	branco	+	0	0	0	0	0	0	+	
<i>C. pulcherrima</i>	0	0	0	cor-de-rosa	+	+	0	+	+	0	0	+	
<i>C. pelliculosa</i>	0	0	0	vermelho- violáceo	+	+	0	+	±	±	0	+	

Fonte: KAMOUN, (1989)

2.4. Classificação das leveduras

O interesse pelo estudo morfológico dos fungos é muito grande em razão de sua imensa diversidade e de sua importância clínica, visto que muitos deles provocam doenças graves e fatais (HIRATA,⁹⁵ 1996). Nesse contexto, o estudo das leveduras patogênicas revela-se particularmente importante, tanto sob o ponto de vista morfológico, como taxonômico.

Desde que foram relacionados como os primeiros microorganismos causadores de doenças nos seres humanos por volta de 1839 (CHARIFKER,³⁸ 1960), a busca de novos agentes etiológicos entre os fungos ganhou inúmeras pesquisas, que culminaram com sua classificação primária, tendo por base suas diferenças morfológicas.

SKINNER & FLETCHER²⁴⁰ (1960) reportam que dentre os métodos utilizados para o estudo das leveduras no tocante ao seu isolamento, saliente-se que elas são facilmente cultivadas em meios de cultura que contenham agar e glicose e com pH entre 4,0 e 4,5, mesmo que o material esteja contaminado com bactérias. Todavia, o seu isolamento de meios muito ácidos não é recomendado, principalmente se o material for de origem animal, porque elas podem não se desenvolver muito bem. Pode-se acrescentar ao meio de cultura alguns antibióticos, como a penicilina e a estreptomicina, para se evitar o desenvolvimento bacteriano, ou ainda da cicloheximida, para inibir os bolores. A *Candida albicans*, a levedura patogênica de maior interesse médico, pode ser identificada rapidamente através de seu isolamento em agar farinha de milho ou de batata, onde produz blastósporos com clamidósporos terminais típicos, ou ainda através da inoculação em animais ou técnicas sorológicas. As suas culturas podem ser mantidas em meios sólidos ou líquidos, e estocadas entre 1 e 4°C, devendo-se contudo preferir as líquidas, uma vez que menos esporos são formados, reduzindo dessa maneira a possibilidade de segregação dos caracteres. Podem ser preservadas por diversos meses, recobrando-as com óleo mineral à temperatura ambiente, uma vez que poucos autores recomendam a sua liofilização, especialmente da *albicans*, que pode apresentar mudanças fisiológicas, incluindo-se aí sua menor viabilidade.

Os estudos sobre a fisiologia dessas leveduras, sobretudo a partir de 1947, além de terem sido feitos em pequena escala, apresentam grande variabilidade, o que fez com que alguns pesquisadores discordassem da validade taxonômica de alguns testes utilizados. Muitos desses estudos foram feitos para se verificar a habilidade dessas leveduras em utilizar alguns carboidratos produzindo gás, ou de usarem pentoses, compostos nitrogenados, vitaminas, produção de compostos como a riboflavina e ácido fólico, que apresentam interesse industrial, ou ainda de enzimas, gorduras, ésteres, esteróis, etc...

Falando sobre a sua citologia, os autores reportam que a composição química de sua parede celular tem sido estudada por muitos anos,

demonstrando muito bem que nas bactérias e em certos fungos, as diferenças nessa composição, especialmente de aminoácidos e de carboidratos, traz importantes auxílios na sua taxonomia. A parede celular da maior parte das leveduras é constituída de manana, quitina e glucana, sendo que todas as espécies do gênero *Candida*, apresentam esses três componentes. Os trabalhos sobre a formação de pseudomicélios, mostraram que ao que parece, resultam de uma aparente quebra na sua manutenção sulfidrílica interna, enquanto que a formação dos clamidósporos, dos filamentos e da película no meio de cultura, dependem de alterações metabólicas internas das leveduras. As mitocôndrias podem ser demonstradas no citoplasma de suas células micelianas, através da coloração pelo cloreto de trifeniltetrazolium, especialmente em células velhas (com mais de um mês) e dessecadas.

Passando a ser pesquisados nos mais diferentes cantos do mundo, começou a haver um grande número de publicações que, além das diferenças metodológicas, traziam interpretações errôneas, contribuindo para provocar uma enorme confusão e discussões sobre o entendimento e classificação sistemática desses microorganismos. SKINNER²³⁹ (1946) salienta que as leveduras trouxeram mais problemas aos microbiologistas do que qualquer outro grupo de microorganismos, durante todo o seu estudo morfológico-taxonômico. Haja vista por exemplo, os problemas com a sua própria nomenclatura, conforme os relatos de LODDER & KREGER VAN RIJ¹³² (1984), que reportam centenas de sinônimos entre as diferentes espécies de leveduras.

O estudo dos fungos e das leveduras ficou praticamente estagnado desde que eles foram observados por Leeuwenhoek em 1680, até 1830, quando foram feitas as primeiras tentativas de classificá-los (REED & NAGODAWITHANA,²¹⁰ 1991).

Com o avanço das descobertas científicas, especialmente o aparecimento de dezenas de novas espécies de fungos e leveduras, sentiu-se a necessidade cada vez maior, de agrupar esses microorganismos em gêneros, famílias e, finalmente num Reino, que melhor pudesse representar

todas as suas características morfológicas e comportamentais comuns, diferenciando-os, dessa maneira, dos outros microorganismos e seres vivos. Desse modo, a sistemática, cuja função básica é coordenar os grupos das enormes variedades de formas observadas na natureza, classificando-os em grupos e determinando seus diferentes graus de parentesco e de hierarquia, permitiu o reconhecimento de suas múltiplas relações de afinidade e facilitou a descoberta de novas características (cf. HÖFLING,⁹⁶ 1976 e VIDAL & VIDAL,²⁸⁰ 1985), favorecendo uma taxonomia mais real.

LACAZ¹²⁰ et al (1970), revela-nos que foi Pier Antonio Michelli, o primeiro pesquisador que se preocupou de maneira mais objetiva em organizar os fungos em chaves de classificação, apesar do próprio Linneau ter-se preocupado em introduzi-los junto aos vegetais.

As controvérsias a respeito da nomenclatura mais correta a ser utilizada para as leveduras, persistiram por muito tempo, desde que Quinquaud colocou-as no gênero *Syringospora* e Robin no gênero *Oidium*, em 1869 e, Will no gênero *Mycotorula*, em 1916. Em 1923, Berkout conseguiu estabelecer as bases para a classificação das leveduras, colocando-as em diversos gêneros, sendo o gênero *Candida* o que nos interessa mais de perto. Como se percebe, não foi tão fácil se chegar a um acordo sobre o nome correto a ser utilizado para o gênero, existindo ainda as propostas de LANGERON & GUERRA, em 1938 (cf. ESTEVES⁶² et al., 1967) e de Diddens & Lodder em 1939, preferindo chamá-las de *Candida*. Tal situação perdurou durante a realização de diversos Congressos Internacionais de Botânica, como os de Nova Iorque em 1939 e o de Estocolmo, em 1950. Finalmente, em 1959, durante o 9º Congresso Internacional de Botânica, realizado em Montreal, no Canadá, resolveu-se manter o nome *Candida* do gênero em virtude da sua ampla utilização (*nomen conservandum*) substituindo-se todas as terminologias mais antigas, como por exemplo *Oidium* e *Monilia*, conforme nos informa LODDER & KREGER VAN RIJ¹³² (1952).

WEBERLING & SCHWANTES²⁸¹ (1986), relatam que Carl von Linné (1707-1778) botânico sueco, é considerado o "Pai da Sistemática". REED &

NAGODAWITHANA²¹⁰ (1991) relatam que ele arranhou as plantas e animais em 24 classes diferentes incluindo os fungos na última classe (*Cryptogamia*). As formas microscópicas receberam especial atenção, porque nesse tempo acreditava-se na teoria da geração espontânea. O sistema de *Linnaeus*, publicado em sua *Systema Natura*, cuja 10ª edição surgiu em 1758, serviu de base para a nomenclatura taxonômica de Bailey, em 1933. A taxonomia das leveduras começou somente em 1837, quando Meyer colocou o gênero *Saccharomyces* na classificação. Somente 50 anos mais tarde os estudos sobre as leveduras tiveram novos impulsos, graças aos trabalhos de Hansen, nos Laboratórios Carlsberg, trabalhando com leveduras em culturas puras, por mais de 30 anos. Salientam que apesar da preponderância das disciplinas fisiológicas na pesquisa e na teoria, a sistemática continua sendo muito importante para a Biologia, estabelecendo uma imagem a mais completa possível da grande diversidade dos organismos, compreendendo ao mesmo tempo as relações formais entre eles e o reconhecimento das leis biológicas gerais. Desse modo, deve-se procurar conhecer e obter todos os dados sobre a forma e o tipo de vida, sua distribuição, variabilidade e, todas as suas demais qualidades, para que se possam saber quais são os iguais e quais os não-iguais, organizando-os num sistema claro. Em Botânica, os autores dizem que a Taxonomia tem um caráter analítico-descritivo, enquanto que a Sistemática tem uma orientação sintético-comparativa.

A determinação entre os limites dos grupos de organismos (espécies ou grupos de nível superior ou inferior), é chamada de TAXONOMIA. As unidades sistemáticas são diferenciadas umas das outras e determinadas, conforme a sua categoria, sendo chamadas de "taxon" ou "taxa" (taxons). É tarefa da taxonomia, estabelecer com maior exatidão possível, as diferenças e delimitações entre os grupos de organismos, o que se torna mais difícil à medida que aumenta o número de organismos pesquisados e, tendo-se em vista também, que quem classifica deve conhecer todo o conjunto e as suas características individuais. Os níveis hierárquicos do sistema são importantes para se compreenderem as diversas categorias. As diferenças ou

semelhanças devem ser o mais constantes possíveis num certo grupo de organismos, para que a sistemática tenha valor e exiba um grau de parentesco natural mais próximo. Para que ocorra uma denominação única e internacional, os organismos recebem nomes científicos (latinos ou latinizados), cuja organização e aplicação é regulamentada pelo Código Internacional de Nomenclatura, destacando-se as regras do exemplar-tipo, da prevalência do nome mais antigo, da combinação binária do gênero e da espécie, seguido do autor e da regra da prioridade, no caso de outros autores.

REED & NAGODAWITHANA²¹⁰ (1991), salientam que o termo sistemática é utilizado em sentido amplo, como sinônimo de taxonomia. O termo taxonomia vem do grego "taxis" (arranjo) e "nomos" (lei) e é um ramo da sistemática que inclui a classificação, identificação e a nomenclatura dos seres vivos. A classificação filogenética se preocupa em estudar as classificações entre os organismos, o que somente é possível se existirem suficientes fósseis para exame. Nesse caso, sob o ponto de vista dos microorganismos e, em especial das leveduras, a delicadeza e o pequeno tamanho de suas células, impede o seu estudo mais pormenorizado.

WHITTAKER²⁸³ (1989), reporta os novos conceitos sobre os reinos dos organismos vivos, que podem ser classificados de maneira diferente do que os dois reinos até aqui então existentes (animal e vegetal), levando-se em conta as novas relações evolucionárias. Salienta que existem ainda muitas limitações a esse sistema de classificação, que existe desde o tempo de Linnaeus. Essas limitações, por exemplo, podem ser vistas na classificação dos protistas, dos moneranos e dos flagelados, em relação aos fungos superiores e, também, nos próprios fungos, que mais recentemente foram separados das plantas em virtude de suas diferentes origens, diferentes direções evolutivas, organizações e adaptações, principalmente frente à sua nutrição primária.

Os fungos são originários de seres unicelulares, alguns dos quais flagelados e, mesmo que alguns autores achem que derivam das algas e das plantas, apresentam uma organização bem diferente delas, sobretudo nos

fungos superiores, que apresentam micélio e diferenças reprodutivas das plantas superiores, que são diplóides. É provável que os fungos apresentem correlações estruturais convergentes com as algas, como por exemplo o ciclo de vida e, também com as bactérias miceliais (actinomicetos), o que tem atrapalhado ainda mais a sua correta classificação.

COPELAND (cf. WHITTAKER,²⁸³ 1989), entre 1940 e 1950, propôs a classificação dos seres vivos em 4 Reinos: Micota ou Monera; Protoctista; Plantae e, Animalia. Contudo, como o sistema de classificação também apresenta limitações, principalmente no campo dos modos de nutrição, nos limites entre os animais e plantas unicelulares e, no agrupamento de outros seres em um único Reino, como o Protista, houve a necessidade de se aprimorar mais ainda o sistema de classificação, surgindo então o sistema de cinco Reinos. Dessa forma, os cinco Reinos propostos, são os seguintes: Reino Monera; Reino Protista; Reino Plantae; Reino Fungi; Reino Animalia. O Reino dos fungos tem relação com o dos animais e plantas superiores, existindo uma linha mais definida de separação entre os fungos inferiores e os protistas, através dos estudos de Simpson e outros autores, ao final da década de 50. Esse novo tratamento classificatório dos seres vivos, trouxe um grande aumento no número de "taxa", representando melhor o que ocorria sob o ponto de vista das relações entre os organismos e suas maneiras de nutrição (fotossíntese, absorção e ingestão). Apesar disso, essa classificação em cinco reinos, também tem as suas limitações, como a dificuldade em se distinguir a linha separatória entre a organização dos unicelulares, dos multicelulares e, dos multinucleados.

JOLY¹⁰⁵ (1954), em sua tese de doutoramento, relata que Pasteur foi o introdutor dos estudos que forneceram os melhores conhecimentos sobre as leveduras. Bucher mais tarde, prestou uma valiosa colaboração, ao descrever a zimase alcoólica e, em 1909, Guilliermond começou a esboçar a linha filogenética das leveduras, fundamentando suas opiniões no estudo morfológico que realizou das mesmas.

Cita Stelling-Dekker, que dividiu-as em dois grupos (famílias), baseando-se na formação ou não de micélios e, mais tarde, Guilliermond acrescentou outra divisão, baseando-se nas suas linhas de descendência. Estudos posteriores realizados por Winge & Laustsen e ainda por Guilliermond, em 1940, foram acrescentando novas relações entre os seres desses grupos, especialmente entre as leveduras e os basidiomicetos, relacionando-os finalmente com os fungos. Foi por volta de 1938, que Jelinek reportou serem as reações sorológicas os melhores métodos para se classificarem as leveduras, justificando tal escolha pelo fato dos micróbios apresentarem grande variabilidade e, a inconstância dos caracteres celulares, fomentadora dos erros da sistemática morfológica. Outro autor, Benham, afirmava que o método sorológico era superior àqueles que se utilizavam de provas de fermentação e aspectos morfológicos.

VAN DER WALT (cf. SKINNER²⁴¹ *et al.*, 1980), reporta que os critérios para a delimitação das espécies (especiação) das leveduras, basearam-se nos seguintes aspectos:

- discontinuidade fenotípica: baseia-se nas diferenças morfológicas, propriedades fenotípicas e propriedades fermentativas e assimilatórias;
- infertilidade: baseia-se na capacidade de uma levedura poder hibridizar-se ou, então, o seu híbrido possuir fertilidade reduzida;
- análise dos ácidos nucléicos: baseia-se na análise dos ácidos nucléicos das bases do DNA ou na homologia do DNA-RNA;
- taxonomia prática: baseia-se em estabelecer critérios práticos para poder diferenciar uma espécie da outra.

Essas técnicas podem contribuir em mais de 80% dos casos, para a correta classificação taxonômica dos fungos.

Desse modo, as leveduras que nos interessam neste trabalho, são classificadas corretamente, segundo o que segue:

- Reino: *Mycetae* ou *Fungi* ;
- Divisão: *Deuteromycota* ;

- Sub-divisão: *Deuteromycotina* ;
- Classe: *Deuteromycete* ;
- Sub-classe: *Blastomycetidae* ;
- Família: *Cryptococcaceae* ;
- Gênero: *Candida* .

SHIMIZU²³⁸ (1990), em sua tese de docência-livre, salientou também que segundo Lodder & Kreger Van Rij em 1984, a espécie *albicans* está incluída no grupo VII desse gênero, apresentando reação negativa ao azul de diazônio B. Além disso, segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, no período de 1980 a 1989, a candidose foi a doença que mais frequentemente esteve associada à Aids, afetando cerca de 32% dos pacientes. Salienta que o gênero apresenta atualmente 196 espécies, sendo a espécie *albicans* uma das mais estudadas em virtude de sua patogenicidade, que tanto é maior quanto maior a sua capacidade em produzir enzimas proteolíticas, como a hialuronidase, proteinase, condroitin-sulfatase e fosfolipase.

JOLY¹⁰⁵ (1954) baseou seu trabalho, nos preceitos de Lodder & Kreger Van Rij, que em seu livro sobre as leveduras, de 1952, baseavam a identificação sistemática das leveduras, em seus caracteres fisiológicos, morfológicos e culturais. Como aspectos fisiológicos importantes, destacam a formação de película em meio líquido (é um caráter de aerobiose), o zimograma dos hidratos de carbono, o auxanograma dos açúcares, o auxanograma do nitrogênio, a produção de compostos amiláceos, a produção de ésteres (alguns fornecem por exemplo, o "flavor" característico do "sherry"), a produção de pigmentos carotenóides, a produção de ácidos, o desdobramento de gorduras (característico da *Candida lipolytica*), a coagulação e peptonização do leite (característico da *Candida tropicalis* e da *Candida pseudotropicalis*). Além disso, reporte-se a importância das leis de fermentação de Kluyver-Dekker, que utilizaram a glicose, lactose, maltose, sacarose, galactose, rafinose e às vezes a inulina, para o estabelecimento do zimograma dos hidratos de carbono. Como aspectos morfológicos de inte-

resse, chamou a atenção para as características da reprodução vegetativa, a forma e o tamanho das células, a formação dos ascósporos (seu número é típico para cada espécie, bem como sua forma e aspecto), e a formação de blastóporos. Finalmente, como caracteres morfológicos culturais, devem ser examinadas as consistências das culturas, aspecto e superfície. Prescott e Dunn, em 1940, reportaram ainda que as leveduras podem ser induzidas a esporular, pelo efeito da inanição ou de circunstâncias tóxicas presentes na cultura, o que pode de certa forma, auxiliar a sua identificação.

Em 1960, SKINNER & FLETCHER,²⁴⁰ realizaram uma revisão geral sobre as leveduras do gênero *Candida*, segundo os aspectos de sua nomenclatura, taxonomia, ecologia, métodos de estudo (isolamento, identificação e preservação das culturas) e a fisiologia (produtos metabólicos e nutrição, citologia e antibiose). Antes da década de 60, haviam muitas controvérsias sobre a classificação correta das leveduras, fazendo com que os pesquisadores holandeses, procurassem simplificar a sua identificação, através de testes de fermentação da lactose e testes sorológicos. Também são dignos de nota, os estudos empreendidos a partir de 1947, sobre a ecologia dessas leveduras, mostrando sua associação com os animais, trato gastrointestinal, pele e outros ambientes, como o solo, ar, frutas processadas, camarões, insetos, flores, cogumelos, estrume, padarias, frutas cítricas, frutas processadas, cervejas, tomate, café fermentado, gema de ovo desidratada, exsudato de árvores, infusão de oliveiras, colheitas, ceco bovino, água fresca, água de lagos, membranas mucosas, fezes, etc...

Como algumas características dessas leveduras, os autores chamam a atenção para o fato de que existe um interessante parasitismo entre *Bacterium candidoestruens* e as espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, no qual a bactéria invade as células dessas leveduras, causando a sua ruptura e destruição, com o conseqüente aparecimento de um pigmento brilhante e vermelho, facilmente visível e, que pode, portanto, indicar o aparecimento da levedura. Existem ainda outras associações dessas leveduras com microorganismos, baseadas em alguns produtos utilizados no seu

metabolismo ou produzidos por ele. Destaque-se por exemplo, que alguns produtos oriundos do metabolismo da *Candida albicans*, favorecem o crescimento e o desenvolvimento do *Mycobacterium tuberculosis* e dos lactobacilos da cavidade oral, controlando o seu desenvolvimento pelos níveis de ácido láctico presentes no meio.

Os trabalhos de BARTNICKI-GARCIA¹² (1968), sobre a química da parede celular e o seu papel na morfogênese e taxonomia dos fungos, trouxeram novas luzes para a sua identificação.

Salientam os autores, que a parede celular se constitui numa versátil residência para a levedura pois ela expande-se continuamente através do crescimento, sendo extensivamente remodelada durante o seu desenvolvimento. Através da manipulação da construção de sua parede celular, os fungos podem adquirir uma grande variabilidade nas suas características morfológicas, conseguindo dessa forma realizar várias funções, como por exemplo o crescimento vegetativo, a colonização do substrato, a reprodução, a dispersão, a sobrevivência, a penetração no hospedeiro, a predação no animal, etc... Desse modo, o desenvolvimento morfológico dos fungos, depende da morfogênese da parede celular e, está fortemente relacionado com a taxonomia (filogenia) e a morfogênese (ontogenia). A parede celular é composta de 80 a 90% de polissacarídeos e o restante, de proteínas e lipídeos, existindo alguns exemplos onde a percentagem atinge 40% ou menos, embora sejam raros. Também podem estar presentes pigmentos como a melanina, polifosfato, íons inorgânicos, ácidos nucleicos (ainda não totalmente comprovados), etc... Fisicamente essa parede apresenta um emaranhado de microfibrilas, cimentadas ou ligadas a uma matriz amorfa. Quitina e celulose fazem parte desse esqueleto na maior parte dos fungos, existindo ainda aqueles que usam glucanas não celulósicas. Esses cimentos são compostos basicamente de glucanas, mananas, galactanas, heteropolissacarídeos, e outras substâncias. As técnicas da difração dos Raios-X e da espectroscopia de infra-vermelho, são as mais indicadas para se identificar os polímeros (quitina e celulose) da parede

celular dos fungos. A composição desses polímeros é muito importante para a taxonomia porque alguns pesquisadores, já conseguiram dividir por exemplo, os *Phycomycetos* aquáticos, em duas taxa. O advento de métodos mecânicos que conseguem obter extratos mais puros da parede celular das leveduras, e de outras técnicas como a cromatografia em papel, trouxe um grande avanço no refinamento analítico das técnicas de taxonomia, provocando também uma nova classificação.

A composição química da parede celular pode distinguir os fungos dos outros seres vivos, como por exemplo o conteúdo de celulose e o seu tipo de cristalização, o tipo de ligação glicosídica dos polímeros de glicose, etc.

BARTNICKI-GARCIA¹² (1968), estudou os fungos taxonomicamente, de acordo com a composição química de sua parede celular, como se pode ver no quadro a seguir:

Quadro 9. Taxonomia dos fungos baseada na parede celular

Categoria química	Grupo taxonômico	Traço distintivo
I - celulose-glicogênio	Acrasiales	pseudoplasmodios
II - celulose-glucana	Oomycetos	zoósporos biflagelados
III - celulose- quitina	Hyphochytridiomycetes	zoósporos uniflagelados
IV- quitosan-quitina	Zygomycetos	zygósporos
V- quitina-glucana	Chytridiomycetes	zoósporos uniflagelados
	Ascomycetos	hifas septadas, ascósporos
	Basidiomycetos	hifas septadas, basidiosporos
	Deuteromycetos	hifas septadas
VI - manana-glucana	Saccharomycetaceae	células leveduriformes, ascósporos
	Cryptococcaceae	células leveduriformes
VII - manana-quitina	Sporobolomycetaceae	leveduras (pimentos carotenóides), ballistosporos
	Rhodotorulaceae	leveduras (pimentos carotenóides)
VIII - poligalactosamina-galactana	Trichomycetes	grupo heterogêneo, artrópodes parasitas

Fonte: Bartnicki-Garcia (1968)

Do quadro acima, destaque-se o grupo VI, que apresenta fungos com manana e glucana na sua parede celular. Dentre os fungos desse grupo, destacam-se os do gênero *Sacharomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora* e *Kloeckera*. A quitina está presente mas em pequenas quantidades. A manana e parte das glucanas, é álcali-solúvel, enquanto que as glicoproteínas complexas desses polissacarídeos, têm sido isoladas por diversos autores. A glucana álcali-solúvel, é o componente que forma o esqueleto da parede celular e apresenta ligações beta 1,6 e beta 1,3.

A parede celular também pode ser estudada através do uso de enzimas que provoquem a sua ruptura, como a dissulfito-redutase, que provoca na *Candida albicans*, o seu dimorfismo, em virtude de sua diferente habilidade de brotamento (conforme comprovam os trabalhos de NICKERSON & FALCONE¹⁷⁰ em 1959) e, das glucanases, que participam do fenômeno morfogenético, na fusão e conjugação das células.

Quanto à antibiose, SKINNER & FLETCHER²⁴⁰ (1960), reportam que o uso de muitos antibióticos que eliminam as bactérias do intestino, boca e vagina, não eliminam os fungos, contribuindo portanto para o seu desenvolvimento posterior pela ausência de competição. Foi descrita uma grande variedade de colônias rugosas de *Candida albicans* na flora de pacientes tratados com antibióticos.

Contudo, as técnicas propostas para a identificação taxonômica das leveduras, ganharam com o passar dos anos, muitos acréscimos, com a introdução da biologia molecular e os excelentes trabalhos de NICKERSON¹⁶⁹ (1963), HALL⁸⁴ (1969) e HALL⁸⁵ et al. (1969).

NICKERSON¹⁶⁹ (1963), afirmou que a forma da levedura, se deve à rigidez de sua parede celular, que apresenta muitas macromoléculas em sua constituição, e que suas propriedades físicas de associação, conferem uma estabilidade dimensional. Para que possa ser melhor estudada, os constituintes da parede celular devem ser isolados da melhor maneira possível e, as lavagens das células são requeridas, para se retirarem os restos do meio

de cultura, após o que as células sofrerão ruptura mecânica por meio de colisão, impacto, cortes, sonicação ou outros métodos. Desse modo, as suas enzimas podem ser expostas, provocando a lise celular. O isolamento dos fragmentos da parede celular pode ser feito através da sua ruptura com pérolas de vidro e, o material obtido, está livre dos debris celulares. Outros métodos citados de ruptura das células, incluem o uso de prensas hidráulicas (tipo Huhes), o uso de enzimas para fazer a sua digestão enzimática (obtidas de lesmas ou de bactérias) e outros, devendo posteriormente haver a purificação do material com o uso de centrifugações com soluções tampão, etc. O material daí obtido, é analisado microscopicamente ou ainda com o uso de colorações, para se comprovar a ruptura das paredes celulares. No caso da coloração de Gram, as leveduras são Gram positivas e os restos celulares Gram negativos. A microscopia eletrônica também pode verificar eventuais contaminações do material. Os critérios para pureza incluem a ausência de corpos esféricos pequenos, uma homogeneidade microscópica e a constância da análise do nitrogênio.

O fracionamento das células leveduriformes para a obtenção da parede celular, pode ser feito com o uso de álcalis a 25° C, solubilizando o material da parede, que é composto de um complexo manana-proteína. Deve-se retirar desse material o seu conteúdo de lipídeos através do uso de KOH 1N a 25° C, sob atmosfera de nitrogênio, liofilizando-o depois. Outros autores reportaram o uso de etilenodiamino para fazer o fracionamento da parede celular. Desse modo, os componentes macromoleculares que podem ser isolados da parede celular das leveduras, são os seguintes:

– LIPÍDEOS: extraídos por três processos: tratados com etanol-éter a 25° C; com clorofórmio a 25° C; tratados com etanol-éter a 50° C com 1% de HCl. Geralmente essas três extrações são realizadas no escuro, sob atmosfera de nitrogênio e com solventes frescos e destilados. O material obtido é um complexo de lipopolipeptídeos e lipopolissacarídeos, que provavelmente contribuem para a arquitetura da parede celular.

– **COMPLEXOS POLISSACARÍDEO-PROTEÍNA:** a solução de Fehling precipita os complexos manana-proteína, formando um composto de cor azul e cujo princípio de reação não se conhece. A precipitação de polissacarídeo e do cobre, não é uma evidência de que somente existam resíduos de manose. Existem também os de manose-glucose (2:1), enquanto que outros autores reportam espécies de leveduras que nem apresentam manose. Vários trabalhos tentam determinar com exatidão os componentes desses complexos.

– **PROTEÍNAS:** a análise quantitativa dos aminoácidos das frações isoladas das paredes celulares de leveduras, revelam que elas possuem proteínas associadas à sua parede celular, sendo de composição muito similar e com um caráter marcadamente ácido, em virtude da presença de ácido glutâmico e ácido aspártico ao redor de 31%.

– **MACROMOLÉCULAS COM HEXOSAMINAS:** como por exemplo acetilglucosaminas e glucosaminas que estão ligadas à parede celular e que serviriam como agentes ligantes entre as proteínas e os polissacarídeos, componentes desses complexos.

Com o passar dos anos, outras técnicas puderam ser estudadas, com o intuito de aplicação na taxonomia de fungos e leveduras. Dentre elas, deve-se destacar ainda os trabalhos de SPENCER & GORIN²⁴⁷ (1969), que realizaram um estudo sobre a sistemática das leveduras do gênero *Candida Berkout*, através dos espectros de ressonância magnética protônica de suas mananas e do conteúdo de manoses de seus polissacarídeos. Esses espectros foram depois comparados com os espectros obtidos de outros fungos, tentando-se descobrir eventuais similaridades. Desse modo, classificaram as leveduras desse gênero, em quatro grupos distintos:

– o grupo das espécies classificadas como asporogênicas (perfeitas);

– o grupo das que apresentam espectro dos polissacárides que contém manose semelhante ao espectro das mananas, sendo também espécies perfeitas;

- o grupo das espécies tipo *Candida parapsilosis*;
- o grupo das espécies que não fermentam glicose e que não são incluídas nos outros grupos;

Concluíram finalmente, que a técnica de ressonância magnética protônica, apesar de ser menos fidedigna do que as outras técnicas bioquímicas que podem ser empregadas, podem trazer algumas informações adicionais mais detalhadas sobre a estrutura dos polissacarídeos em solução nos extratos brutos desses microorganismos.

ODDS & TRUJILLO-GONZALES¹⁸¹ (1974), estudaram os níveis de fosfatase ácida presentes nas leveduras do gênero *Candida*, e suas implicações com a taxonomia e identificação desses microorganismos, especialmente das espécies mais patogênicas para os seres humanos. Através de ensaios quantitativos de células intactas de 7 espécies do gênero e de outras leveduras e fungos de gêneros diferentes, encontraram muitas diferenças e poucas similaridades entre as atividades dessa enzima. Os níveis dessa enzima, foram estudados em células intactas dessas leveduras e a pH=2,0, mostrando diferenças estatísticas suficientes para separá-las de alguma forma. Desse modo, os autores puderam identificar as espécies de *Candida guilliermondii* e *Candida pseudotropicalis*, complementando os estudos e métodos de identificação morfológica e fisiológica para as leveduras das espécies *krusei* e *lambica*. A fosfatase ácida da *Candida albicans*, é uma manoproteína localizada provavelmente na superfície da célula leveduriforme, semelhante ao que ocorre com a *Sacharomyces cerevisiae*. Os resultados ainda indicaram que nessa levedura, o máximo de atividade enzimática ocorreu em sua fase estacionária de crescimento. Em termos de níveis mais altos de atividade enzimática, encontraram, de maneira decrescente, as seguintes leveduras: *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida albicans*, *T. glabrata*, *Candida stellatoidea*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e finalmente a *Candida pseudotropicalis*.

SCHERER & STEVENS²²⁵ (1987), reportaram os métodos de tipagem do DNA, aplicados na epidemiologia e taxonomia das espécies de leveduras do gênero *Candida*. Dentre os diversos métodos descritos para a extração do DNA, citaram os que envolvem a digestão e a eletroforese dos fragmentos do DNA, tendo conseguido encontrar mais de 100 padrões diferentes no gel que poderiam ser utilizados para se tipar essas leveduras.

ESTEVES⁶² *et al.* (1977), reportam finalmente os trabalhos de Tsuchiya *et al.* (1961); Akiba *et al.* (1961); Miyake *et al.* (1961); Mikamo *et al.* (1961); Fukasawa *et al.* (1968), que procuraram determinar a estrutura antigênica das diferentes espécies; os de Hasenclever (1961) e (1963), que visaram relacionar a constituição antigênica e a patogenicidade e, os de Biguet *et al.* (1961) e (1965) e os de Van Ky *et al.* (1963) e (1969), que se orientaram na investigação da atividade enzimática dos complexos antígeno-anticorpo dessas leveduras.

CORREA⁴³ (1984), em sua tese de Mestrado, reporta que a levedura *Candida albicans* (Robin) Berkout (1923), pertence à divisão Deuteromycota, sub-divisão Deuteromycotina, classe dos Blastomycetes e família *Cryptococcaceae* (Ainsworth, 1973; Von Arx, 1974). Segundo os estudos de Scherwitz *et alii.* (1978), verificou-se que a parede celular dessa levedura é constituída de cinco camadas: camada granular, camada amorfa, camada mais espessa e de maior densidade eletrônica, camada finamente revestida de elétrons e, finalmente, a camada menos densa, situada logo acima da membrana citoplasmática. Os componentes intracelulares dessa levedura são idênticos aos encontrados em outras leveduras (Carbonell *et alii.*, 1963). As células são uninucleares com um único nucléolo, apresentando envelope nuclear constituído por um par de membranas. Os vacúolos existentes são delimitados por uma única membrana. O retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e ribossomos, são feições constantes do citoplasma.

OLSEN^{187,188} (1990), realizou uma importante revisão sobre os métodos quimiotaxonômicos utilizados na classificação das leveduras, verificando que eles se preocupam essencialmente com a elucidação de suas

composições químicas, ou então com as composições químicas de seus produtos. A análise dos produtos de fermentação e dos sistemas enzimáticos e a sua regulação celular, podem revelar novas características únicas ou comuns aos diversos grupos de organismos. Os avanços nos equipamentos analíticos, como na cromatografia e na eletroforese e outras técnicas físicas e químicas, têm muito contribuído para os avanços da quimiotaxonomia. Dentre essas técnicas, o autor cita as de análise da composição do DNA; os métodos de mapeamento e tipagem do DNA; as de homologia DNA-DNA; os estudos de homologia do RNA ribossômico com o DNA; os métodos de sequenciamento dos aminoácidos das enzimas; os de análise dos polipeptídeos das cadeias protéicas das células leveduriformes; a verificação do sistema de toxinas assassinas (killer) das leveduras; o espectro dos citocromos e, finalmente, as técnicas que analisam os polissacarídeos capsulares.

BARNES¹⁰ *et alii* (1991), estudaram os relacionamentos evolucionários entre espécies patogênicas de leveduras do gênero *Candida* e outras leveduras, através da análise filogenética de seus RNA ribossômicos, verificando relações entre essas leveduras. Salientaram também que o método de classificar as leveduras, de acordo com sua forma sexuada, tem trazido muitas confusões para a taxonomia dos fungos, fazendo com que novas propostas tenham sido formuladas para evitá-las, especialmente as que se baseiam em técnicas do RNA ribossômico, que em alguns fungos é 5S e, em outros, como no caso das *Candida*, é 18S.

2.5. Eletroforese

De acordo com RILBE²¹² (1973), Reuss foi quem primeiramente idealizou e praticou os primeiros ensaios de eletroforese, já no ano de 1809, ao constatar que componentes de uma mistura de substâncias, poderiam ser separados quando submetidos à ação de uma força eletromotriz. No entanto, essas descobertas ficaram parcialmente esquecidas, até que LODGE, em 1886 (cf. FREDRICK,⁶⁸ 1964) resolveu medir as velocidades iônicas num tubo

com gelatina, no qual eletrodos foram ligados. No ano de 1897, Picton e Linder, valendo-se das teorias e trabalhos teóricos de KOHIRAUSCH (cf. DUNN,⁵⁸ 1986) montaram, ainda de acordo com RILBE²¹² (1973), uma aparelhagem que poderia separar substâncias através do uso de corrente elétrica, fato este que os fez realizar inúmeros experimentos e descobrirem que determinados componentes carregados de carga positiva, se concentravam no cátodo, enquanto que os de carga negativa, concentravam-se no ânodo, relatando seus achados em reunião da Sociedade Inglesa de Química.

Por volta de 1909, Michaelis utilizou o registro óptico na migração de íons e denominou "eletroforese" a este procedimento. Köning, em 1937, apresentou no Congresso Sulamericano de Química, realizado no Brasil, meios estabilizados em papel de filtro, utilizando-se dos informes técnicos descritos e realizados por ARNE TISELIUS na Universidade de Uppsala, na Suécia pouco tempo antes, (cf. RILBE²¹², 1973). Assim sendo, (cf. HENEINE,⁹⁴ 1995) PAULO KÖNING foi o brasileiro inventor da eletroforese de suporte, tendo utilizado as tiras de papel de filtro para separar os venenos ofídicos, em pesquisas no Instituto Butantan. Dessa maneira, os experimentos rudimentares da eletroforese puderam ser modernizados, fazendo com que ela pudesse ser executada em laboratórios, preparando-se e abrindo-se o campo, para a pesquisa de novos suportes, o que se concretizaria na década de 40, segundo os relatos de NAOUM¹⁶⁵ 1990.

A partir de então, o estudo sobre a separação de partículas através do uso da eletroforese, ganhou grande impulso e interesse dos pesquisadores, demonstrando vários deles as vantagens do uso de diferentes suportes como por exemplo Havgaard e Kroner, que usaram o papel de filtro, em 1948 Durrum, Grammer e outros, que estabeleceram em 1950 os métodos para laboratório no estudo das proteínas, muito embora RILBE²¹² (1973) cite que Du Vignou *et alii* e Tiselius fossem os pioneiros na separação de proteínas por esses métodos. Kohn, que testou em 1957 o acetato de celulose, verificou que a separação era melhor neste suporte, em virtude do tamanho mais uniforme

de seus poros. PACCOLA-MEIRELLES¹⁹¹ *et alii* (1988) nos relata também as pesquisas realizadas com outros tipos de suportes, tais como o amido, as camadas porosas de vidro em pó, a areia, a pectina, o PVC, a celulose, a sílica gel, além das resinas de troca iônica, que foram testadas sobretudo na eletroforese de zona, onde esses suportes não deveriam ser condutores.

O uso simples, rápido e de alto poder informativo da técnica eletroforética, ganhou grande impulso ainda, com a introdução, na década de 50, dos trabalhos de Vertenberg, que explicaram muito bem o valor da utilização de gradientes artificiais de pH na separação de proteínas, em especial a hemoglobina, conforme RILBE²¹² (1973). GRABAR⁷⁸ *et al.* (1955), fizeram um estudo imunoeletroforético de substâncias antigênicas usando gel de agarose e obtendo bandas independentes.

A década de 60 traz grandes avanços sobretudo na eletroforese analítica, com a introdução por Ornstein e Davis, em 1964, do método em disco, que utilizava como suporte o gel de poliacrilamida. Contudo, DUNN (1986), nos relata ainda que a introdução do dodecyl sulfato de sódio, por Maizel em 1969, juntamente com os trabalhos de Vertenberg, trouxe o refinamento final para que a técnica tivesse ampla utilização, culminando com os trabalhos de Laemmli em 1970, que são amplamente citados pelos mais diversos pesquisadores.

Ainda segundo DUNN⁵⁸ (1986), os trabalhos de O'Farrell em 1975 e de Rosengren *et al* em 1977, contribuíram para o aprimoramento da eletroforese, ao introduzirem, respectivamente, rádio como marcador de proteínas que poderiam ser detectadas numa autoradiografia e, a técnica para a obtenção de curvas de titulação de proteínas, que poderiam ser separadas em amfolitos. RIGUETTI *et al* em 1982 (cf. DUNN,⁵⁸ 1986), criaram o termo imobilinas aos eletrólitos que desenvolveram, baseando-se nos estudos de Rosengren sobre a ligação de ácidos e álcalis sobre o gel.

A padronização e a utilização de vários suportes, como por exemplo o gel de amido, o papel de filtro, a agarose, o gel de poliacrilamida e o acetato de celulose na evidênciação de proteínas, tem sido grandemente ampliada

para estudos em taxonomia, fisiologia e genética de plantas, animais e microorganismos, notadamente no campo da identificação de certos tipos de enzimas ou proteínas solúveis de fungos, segundo os trabalhos de ALFENAS³ *et alii* (1984) e diversos outros autores (cf. citado por ALFENAS⁴ *et alii*, 1991). Segundo ainda esses autores, essa utilização varia grandemente, de acordo com a substância a ser separada e o grau de separação que se deseja obter.

2.5.1. Emprego da técnica eletroforética

À medida que os estudos de eletroforese foram se multiplicando, ficou cada vez mais evidente que a padronização de todas as etapas técnicas, incluindo-se aí o tipo de material a ser estudado (plantas, bactérias, células humanas e de animais, leveduras, etc.); os diferentes métodos de extração das proteínas (físicos e químicos) e a técnica a ser empregada (gel de agarose, gel de amido, gel de poliacrilamida, OFAGE, PAGE-SDS, ...) eram vitais para a boa qualidade dos resultados. Essas proteínas (antigênicas ou não) podem estar presentes no interior das células (intracelulares, citoplasmáticas ou somáticas), na sua parede celular (mananas), ou ainda serem o resultado do metabolismo dos microorganismos, sendo nesse caso encontradas nos filtrados das culturas (LACAZ,¹¹⁹ 1980).

As técnicas eletroforéticas são de grande utilidade na separação dessas proteínas, permitindo dessa maneira o seu estudo mais pormenorizado. A técnica de PAGE foi empregada com sucesso, no estudo inicialmente de proteínas solúveis de plantas (STEWART & BARBER,²⁵² 1964), tendo demonstrado bons resultados, no estudo qualitativo. Quantitativamente, notou-se que é necessária a extração completa das proteínas, para se conseguirem os resultados satisfatórios.

Também foi utilizada no estudo de proteínas séricas de coelhos (BIGUET¹⁶ *et alii*, 1962), enzimas (SHAW,²³⁴ 1965) e taxonomicamente em diversos trabalhos para identificar proteínas de bactérias (AMES,⁸ 1974) múmias egípcias (JONES,¹⁰⁶ 1985 e PÄÄBO,¹⁹⁰ 1985), protozoários e fungos, como os dermatófilos (SHECHTER²³⁶ *et alii*, 1966a e 1966b), os do gênero

Phytophthora (HALL⁸⁵ et al., 1969) e os que provocam micoses pulmonares (GALUSSIO⁷⁰ et al., 1973), além de vírus (BITTENCOURT & LACAZ,¹⁷ 1992 e THOMANN & GATTI,²⁶³ 1995).

ROBINSON (cf. GIBBS & SHAPTON,⁷⁶ 1968) reportou o uso da eletroforese em gel para analisar a parede celular e identificar as bactérias corineformes. Realizou a extração dos componentes dos protoplastos lisados pelo ultrassom dessas bactérias e os analisou em gel de amido. Os resultados mostraram a heterogeneidade do grupo, permitindo uma separação das bactérias segundo alguns padrões.

Outros autores, como TUCKER & FAIRBROTHERS²⁷¹ (1970) realizaram a extração de proteínas de plantas do gênero *Mentha*, através da eletroforese de disco. Padronizaram inicialmente o método da extração que melhor se aplicava para essas plantas e verificaram que as bandas de proteínas obtidas, quando tratadas com o 2-mercaptoetanol, eram melhor visíveis do que aquelas tratadas por outros métodos.

TANNER²⁶⁰ et al. (1986) estudaram e identificaram um novo tipo de bactéria — *Bacteroides forsythus* sp. nov. — isolada da cavidade oral de humanos, através do uso da eletroforese em gel de poliacrilamida. Esses mesmos autores, caracterizaram cepas de *Wolinella* spp, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis* e *Eikenella corrodens*, através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Cada espécie apresentou bandas bem distintas das outras, que foram coradas pelas técnicas em prata, que identificaram bem as amostras frescas. As bandas variavam de 20.000 a 205.000 Daltons. Os coeficientes de correlação mostraram bem as diferenças entre as espécies.

TAMURA²⁵⁸ et alii (1993), diferenciaram *Erysipelothrix rhusiopathiae* de *Erysipelothrix tonsillarum* pela técnica da eletroforese em poliacrilamida com SDS, das proteínas celulares. As 16 cepas estudadas mostraram semelhanças e diferenças em seus padrões eletroforéticos, indicando com isso haver uma certa heterogeneidade fenotípica no gênero. Esse método comprovou-se útil para a taxonomia dessas bactérias. As colônias típicas foram cultivadas em meio líquido por 48 h a 37°C, centrifugadas; as células revestidas com salina

fisiológica e colocadas no tampão solubilizante. A eletroforese foi feita em gel de corrida de 10% e os padrões colocados puderam indicar aproximadamente os pesos moleculares das bandas determinadas.

SÁ²²¹ *et alii* (1993), determinaram a variabilidade na capacidade de fixação de N₂ de estirpes de *Rhizobium*, através do padrão de suas proteínas no PAGE-SDS. As células foram arrebetadas por sonicação e os géis utilizados tinham concentração variando de 7,5 a 17,5%. Os resultados indicaram que havia diferenças entre os padrões de proteínas entre as cepas, mas não entre as cepas das mesmas espécies. Foram encontradas ainda diferenças entre as estirpes inter e intra específicas.

2.5.1.1. Técnicas eletroforéticas utilizadas na identificação de fungos e leveduras do gênero *Candida*

A literatura pertinente ao uso da técnica eletroforética para estudos taxonômicos de fungos e leveduras é bastante extensa.

Em 1973, SHECHTER²³⁵ reportou que a aplicação da eletroforese de proteínas nos estudos de taxonomia de algas e fungos, havia se expandido muito na última década (de 1960). Juntamente com HALL⁸⁴ (1973), no Simpósio Internacional sobre o uso da eletroforese na taxonomia de algas e fungos, comentou que a taxonomia dos fungos é baseada largamente na sua morfologia, segundo os trabalhos pioneiros de Ainsworth em 1971. Salienta ainda, que apesar da utilidade dos caracteres morfológicos, outros caracteres devem ser considerados na taxonomia, uma vez que ela deve ser ao mesmo tempo o método e a prática da classificação sistemática. Além disso, a morfologia é inadequada ou dificultosa em muitas situações. Como exemplo cita os casos das leveduras, que segundo Kreger Van Rij, em 1962, deveriam ser examinadas também em seus caracteres químicos e fisiológicos, para se poderem distinguir algumas outras características. As leveduras do gênero *Candida*, podem ser adequadamente identificadas, segundo cada espécie, nas suas diferentes bandas de mobilidade eletroforética.

Também em 1973, AXELSEN⁹ estudou os métodos imuno-eletroforéticos quantitativos, como guias na padronização dos materiais para se realizarem os testes imunoquímicos das leveduras do gênero *Candida*, salientando que os antígenos, foram obtidos pelas técnicas convencionais, que incluem a ruptura das células utilizando-se de pérolas de vidro.

Os trabalhos de FAUX⁶⁵ *et alii* (1975), demonstraram as dificuldades em se obterem os extratos antigênicos das leveduras para estudo, em virtude dos problemas com a sua correta padronização. Para a obtenção dos antígenos somáticos, dada a grande variabilidade dos métodos de obtenção, a padronização passa a ser vital para que a reprodutibilidade seja boa. A purificação das amostras de extratos assim obtidos, apesar de desvantajosa, porque alguns dos antígenos podem perder-se no processo, poderá auxiliar o diagnóstico das infecções fúngicas severas pelas leveduras do gênero *Candida*, permitindo que ele seja consideravelmente mais rápido.

GOTTLIEB⁷⁷ (1977), fez um importante retrospecto sobre o uso da eletroforese na sistemática de plantas e fungos, mostrando as suas vantagens e limitações. As primeiras evidências dos seus estudos e de variações eletroforéticas em populações naturais, foram feitas com os géis de amido e os géis de poliacrilamida, nos quais as variantes enzimáticas dos fungos, poderiam ocorrer em virtude de suas diferentes cargas eletrostáticas ou de seus diferentes tamanhos ou configurações, comportando-se, desse modo, em bandas diferentes. Assim sendo, muitas isoenzimas puderam ser detectadas, o que permitiu uma análise da estrutura protéica e, em último grau, do próprio gene. A maior vantagem da eletroforese é a sua colinearidade, o que permite comparações sistemáticas entre produtos de genes homólogos. Além disso, permite evidenciar diretamente e quantificar, as enzimas estudadas, promovendo várias informações genéticas. Um de seus problemas, é que podem aparecer, em alguns casos, enzimas do metabolismo intermediário da levedura, ou da catálise, provocando interferências nos resultados. Outro problema notado por Shaw em 1970, é que cerca de 30% dos nucleotídeos podem sofrer substituições, fazendo com que os aminoácidos possam ter

mudanças em suas mobilidades eletroforéticas. Além disso, aloenzimas com a mesma mobilidade eletroforética, não necessariamente possuem seqüências idênticas entre os seus aminoácidos. A desnaturação pelo calor é outro fator que interfere na técnica (Bernstein et. al., 1973), além das variações dos tamanhos dos poros dos géis (Johnson, 1976). Observe-se finalmente, que a eletroforese não permite conclusões sobre o número e as seqüências dos aminoácidos ou ainda das etapas mutacionais que podem causar diferenças nas motilidades das enzimas. Outros métodos necessitariam ser utilizados em conjunto com ela, como por exemplo a análise genética ou da progenitura, para se conseguirem outras informações importantes.

VAUGHAN-MARTINI²⁷⁸ et al. (1993), utilizaram-se da cariotipagem eletroforética como ferramenta na taxonomia das leveduras do gênero *Saccharomyces*. Realizaram o teste em 10 cepas desse gênero, usando a eletroforese em campo cruzado com modificações de campo elétrico homogêneo que contornava as amostras. O número de bandas obtidas, variava entre 6 e 17 e os pesos moleculares calculados dos genomas haplóides, variavam entre 7,9 e 14,6 Mbp. Os cromossomos leves, compreendiam pesos moleculares menores do que 500 Kb; os médios, entre 500 e 1000 Kb e os pesados, acima de 1000 Kb. Compararam ainda diversas técnicas de eletroforese e as linhas obtidas, de acordo com o que segue:

Quadro 10. Técnicas eletroforéticas e graus de resolução.

Aparato	Linhas	máxima separação Kb	observações
OFAGE	curvadas	1.000	cromossomos grandes não são separados; só dá para 5/6 amostras/corrida
FIGE	retas	1.000	precisa de rampa para evitar movimentos disformes das moléculas
TAFE	retas	10.000	géis pequenos; poucas linhas para aplicar
CHEF	retas	12.000	bolhas distorcem as linhas em corridas longas.

OFAGE = eletroforese ortogonal não uniforme;

FIGE = eletroforese uniforme em campo invertido;

TAFE = eletroforese transversa alternada;

CHEF = eletroforese homogênea em campo elétrico que contorna as amostras;

Obs.: cada banda corresponde à expressão de um único cromossomo.

GREENFIELD & JONES⁷⁹ (1981), purificaram e caracterizaram os antígenos citoplasmáticos de *Candida albicans*, por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida com laurilsulfato de sódio (PAGE-SLS) e outros métodos bioquímicos e imunológicos. As células leveduriformes foram fraturadas em prensa hidráulica francesa, de 700 a 1000 Kg/cm² e, os extratos antigênicos assim obtidos, foram purificados pela cromatografia em coluna com DEAE-celulose e, também por cromatografia de afinidade, usando a concanavalina A. Verificaram que os processos de purificação diminuíam a concentração das proteínas, prejudicando a identificação final e o uso do método em larga escala.

GREENFIELD & JONES⁸⁰ (1982), compararam os extratos citoplasmáticos de oito espécies de leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces*, através da técnica da imuno-eletroforese cruzada. Salientaram que os antígenos citoplasmáticos foram obtidos segundo os trabalhos de Jones em 1980, sendo purificados da mesma forma anterior, através da cromatografia. Verificaram, contudo, diferenças qualitativas e quantitativas nos padrões obtidos, excetuando-se para a levedura da espécie *glabrata*, que não apresentou reações com o antisoro do homogenato de *Candida albicans* sorogrupo A, cepa B 311. Tal fato permitiu um rápido diagnóstico das infecções fúngicas sérias, com exceção das provocadas pela espécie *glabrata*.

STIPES²⁵³ et al. (1982), diferenciaram *Endothia gyrosa* e *Endothia parasitica* pela eletroforese de disco de suas enzimas e proteínas intramceliais. Esses extratos foram obtidos por pulverização em acetona e separados pela eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados mostraram a presença de 31 bandas de proteínas coradas pelo Coomassie-blue, complementando os resultados morfológicos da separação entre essas espécies.

SOLTIS²⁴⁶ et alii, (1983), reportaram que no caso da eletroforese em gel de amido, os diferentes extratos obtidos podem provocar alterações nos padrões encontrados, levando a interpretações errôneas do material.

ALFENAS & HUBBES em 1984, (cf. ALFENAS⁴ et al., 1991), estudaram os padrões das proteínas e enzimas isoladas de *Cryptothecia cubensis* no que diz respeito às suas virulências, através do PAGE. Foram encontradas diferenças nos padrões de esterase, peroxidase, phosphoglucomutase e hexoquinase nos isolados do Havaí, Brasil e África. As proteínas intramceliais foram extraídas após 7, 14 e 21 dias de incubação e determinadas pelo método de Bradford. A eletroforese foi feita com gel a 7,5%, a concentração da proteína ajustada a 150 µg/amostra e corrida a 200 V. Utilizou-se padrão de peso molecular variando de 14.400 a 92.500. Os resultados desse estudo mostraram algumas diferenças e similaridades entre os isolados do fungo, no que diz respeito aos seus padrões de proteínas e isoenzimas. Uma vez que essas enzimas e isoenzimas estão sob controle genético, eles revelam as relações genéticas entre os isolados, três dos quais variaram de patogenicidade. Os padrões de proteínas mostraram muitas diferenças, incluindo-se alterações na coloração de suas bandas, que mudou dependendo do meio de cultura empregado. A extração das proteínas dos meios que contém compostos fenólicos, apresentou problemas, uma vez que elas são susceptíveis aos fenóis, ligando-se a eles com pontes de hidrogênio, afetando sua atividade.

MOREIRA & ALFENAS¹⁶² (1985), diferenciaram espécies de *Cylindrocladium* por meio da análise eletroforética de proteínas e isoenzimas em géis de poliacrilamida. Verificaram que haviam variações entre cepas deles, no tocante aos substratos e da idade da cultura.

CARLE & OLSON³² (1985), estudaram os cariótipos eletroforéticos de leveduras. Separaram as moléculas do DNA cromossômico de uma cepa padrão de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae*, em 12 bandas bem definidas, pela eletroforese de campo alternado ortogonal. A técnica de hibridação do DNA-DNA, derivada dos genes clonados, foi utilizada para correlacionar esse padrão de bandas, com os cromossomos das leveduras geneticamente definidas. Dessas 12 bandas, 9 mostraram ser simples e 3 compostas de pares que migraram juntos, uma vez que 15 cromossomos foram

identificados. Utilizaram gel de agarose para a corrida eletroforética. Essa técnica pode ser usada em conjunto com a citometria de fluxo e a microscopia eletrônica para a devida cariotipagem dessas leveduras.

PONTON & JONES¹⁹⁹ (1986), fizeram uma análise dos extratos obtidos da parede celular de *Candida albicans*, pelas técnicas do Western Blot e pelo PAGE-SDS. Verificaram que existem diversas técnicas para se extrair os antígenos da parede celular dos tubos germinativos dessas leveduras, comparando-as nesse trabalho. Para tanto, utilizaram-se de protease, quitinase, dithiothreitol (DTT) e iodoacetamida, para extraí-los. Descobriram que a concentração dos antígenos protéicos, era maior na fase micelial do que na fase leveduriforme das leveduras. O DTT foi o melhor extrator para os componentes externos da parede celular, do que os outros produtos utilizados para a extração.

CARLE³³ *et al.* (1986), reportam a técnica da eletroforese com inversão periódica do campo elétrico para separar grandes moléculas de DNA. Salientam que na eletroforese com gel, os ácidos nucléicos e os complexos proteína-detergente, podem migrar na mesma proporção. Para as moléculas de DNA, esse efeito pode ser evitado, invertendo-se periodicamente o campo elétrico do procedimento, obtendo-se uma resolução dos DNAs com tamanhos de 15 a 700 kilobases. Em separações eletroforéticas convencionais que se utilizam de géis de agarose, as moléculas nativas de DNA de 15 a 20 Kb são das maiores que podem ser separadas. Moléculas maiores, apresentam o fenômeno de migrarem juntas, o que recebe o nome de migração reptiliana. Outros autores, reportaram o uso dessa técnica para resolver DNAs de leveduras e de protozoários (Carle & Olson, 1984). Essa técnica proposta recebeu o nome de OFAGE.

CHU⁴¹ *et al.* (1986), reportam a técnica do contorno homogêneo do campo elétrico para separar grandes moléculas de DNA. DNAs que apresentem 2 megabases podem ser bem separados por essa técnica e os menores de 50 Kb são separados sem distorção. Estudaram os padrões das bandas eletroforéticas dos DNAs de leveduras, pela técnica da eletroforese em

gel de campo alternado ortogonal. Salientam que as técnicas de eletroforese permitem separar moléculas de DNA de 30 a 2000 pares de kilobases. A coloração com o brometo de etídio, comparou-se em resolução, com a do Coomassie-blue. Encontraram 3 cromossomos na *C. albicans*. As amostras foram obtidas com o uso da zimolase e da proteinase K. Encontraram pequeno nº de bandas de DNA nas leveduras do gênero *Candida* estudadas, 3 na *albicans*, e uma na *utilis* e *shenatoe*, muito embora possuíssem tamanhos diferentes. Esse fato demonstrou que diferentes padrões podem ocorrer entre espécies de um mesmo gênero. Citam os trabalhos de Hilton *et al.* (1985), que encontraram 3 cromossomos na *C. albicans* com 4 a 7 bandas.

JOHNSTON & MORTIMER¹⁰⁴ (1986), estudaram o cariótipo eletroforético de cepas laboratoriais e comerciais de *Saccharomyces* e de outras leveduras. Das 29 cepas de *Saccharomyces* estudadas, 24 apresentaram padrões cromossômicos de bandas muito semelhantes (de 14 a 17 bandas com tamanho entre 200 e 2000 Kb), conforme o que foi detectado pela eletroforese ortogonal de campo alternado. Entretanto, muitas dessas cepas mostraram padrões de bandas únicos, devidos a cromossomos polimorfos. *Candida albicans* e *C. utilis*, entre outras leveduras, mostraram bandas indicativas de um pequeno número de grandes cromossomos (> 1000 Kb). Uma espécie de levedura do gênero *Saccharomyces* mostrou que deveria ser incluída em outro gênero, em virtude das diferenças em grande número de cromossomos.

SNELL & WILKINS²⁴⁴ (1986), separaram as moléculas de DNA cromossômico da *C. albicans*, pela técnica da eletroforese em campo cruzado. Para tanto, realizaram uma modificação da técnica original, que consistia em realizar o procedimento eletroforético a 35°C, mostrando ser melhor para realizar a separação do que a temperaturas mais baixas. Detectaram 6 bandas cromossômicas dessa levedura. Concluíram que esse procedimento possibilitaria a preparação de provas específicas com o DNA dessas leveduras e que cepas diferentes poderiam ser analisadas pela eletroforese em campo cruzado, com o intuito de determinar translocações e aneuploidia.

GATERMANN⁷³ *et al.* (1986), procuraram identificar os antígenos da *C. albicans*, reconhecendo-os com os soros de pacientes com candidíase. Para tanto, utilizaram as técnicas do PAGE-SDS e do imunoblot. Verificaram que os traçados eletroforéticos obtidos eram similares, mas uma cepa mostrou uma banda diferente na região de 60 Kd, provavelmente de uma proteína de membrana. Esses resultados sugeriram que os testes baseados na identificação dessas proteínas (uma outra foi encontrada na região de 43 Kd), podem facilitar o diagnóstico da candidíase sistêmica.

CHU⁴¹ *et al.* (1986), reportaram a técnica de separação de grandes moléculas de DNA através da eletroforese em campo homogêneo. Salientam que o campo elétrico pode ser manipulado convenientemente de maneira a predeterminar os potenciais elétricos envolvidos. Esse método pode ser aplicado para um amplo espectro, para resolver os problemas de separação de macromoléculas em géis de eletroforese. As moléculas de DNA de tamanhos de até 2 megabases, poderão ser bem separadas pela eletroforese em campo homogêneo que se altera em ângulos de 120°C. Verificou-se que os padrões de separação independem de sua posição no gel, o que é uma vantagem sobre outros métodos. DNAs menores do que 50 kilobases podem ser separados sem distorções mesmo em altas voltagens. A técnica também mostrou-se eficiente para detectar as poucas bandas em DNAs com menos do que 200 bases.

CARLE³³ *et al.* (1986), estudaram as grandes moléculas de DNA separadas eletroforéticamente pela técnica de inversão periódica do campo elétrico. Os ácidos nucleicos e os complexos detergente-proteína de tamanhos semelhantes, poderão eventualmente migrar na mesma proporção. Para as moléculas de DNA, esse efeito pode ser minorado pela simples inversão periódica do campo elétrico (de 10 para 0,01 KHz), sendo possível resolver seletivamente DNAs de tamanhos entre 15 e 700 kilobases.

BROWN & BIRD²⁵ (1986), verificaram que a análise molecular de muitos problemas da genética, podem ser facilitadas pela habilidade de construir mapas de restrição do DNA genômico. A técnica da eletroforese com

gradiente de campo cruzado, é empregada para analisar fragmentos de DNA de aproximadamente 2000 pares de kb de comprimento, que são cortados pelas enzimas de restrição, num total de 1500 kb do DNA genômico do camundongo. Os sítios para essas enzimas, estão encrustrados no genoma.

LEE¹²⁵ *et al.*, (1986), reportaram também as dificuldades em se identificar corretamente a levedura *Candida albicans* de maneira rápida, o que seria muito importante nas Unidades de Terapia Intensiva hospitalares, pois poderia reduzir sensivelmente as taxas de óbito observadas. Reportam os trabalhos de Hasenclever & Mitchell (1961) sobre a sorotipagem; os de Brown-Thonsen (1968) sobre a morfotipagem; os de Odds & Abbott (1980) sobre a biotipagem e, os de McCreigh & Warnock (1982) sobre a resistotipagem e, chamam a atenção de que em todos eles, houve grande dificuldade em se fragmentar as leveduras, para os estudos posteriores. Os métodos mais utilizados por esses pesquisadores, na fragmentação das leveduras, incluem a sonicação, a penetração enzimática com alfa-manosidase ou com a anfotericina B, e a ruptura mecânica. Comparando-se os diferentes métodos com os resultados obtidos pelo PAGE-SDS usando-se diversos padrões, concluíram que essas técnicas não são muito boas para uma identificação rápida das leveduras, em virtude do seu tempo prolongado.

LOTT¹³³ *et al.* (1987), efetuando a cariotipagem eletroforética para a *Candida albicans*, descobriram grandes cromossomos múltiplos. Através do uso da eletroforese de inversão de campo, definiram o cariótipo dessa levedura. Esse cariótipo é diferente do de outras espécies do gênero, sendo portanto espécie-específico. Um total de 5 diferentes grupos de cromossomos móveis foram detectados, sendo pelo menos dois fragmentos de cada um. Esses fragmentos, pelo seu tamanho nos cromossomos grandes, parecem estar morfológicamente relacionados com a levedura *S. cerevisiae*, o que nos faz pensar que esse cariótipo é o resultado de uma migração de cromossomos intactos. Citam que Snell & Wilkins, em 1986, descobriram pela mesma técnica que o genoma dessa levedura, era constituído de cromossomos grandes. As condições de cada experimento podem interferir muito nos padrões

encontrados. A temperatura do gel mostrou interferir muito na mobilidade cromossômica e portanto os autores realizaram-na em banho mantido a 13°C. Encontraram grandes diferenças nos cariótipos eletroforéticos das cepas utilizadas, o que foi uma grande surpresa, considerando-se o alto grau de similaridade morfológica nesse gênero. Concluíram, portanto, que o cariótipo eletroforético dessa levedura, é espécie-específico. A maior difusibilidade das bandas representam provavelmente um número maior do que um cromossomo por banda. Para resolver o problema, realizaram a eletroforese em duas dimensões e verificaram que muitos grupos apresentavam mais do que dois membros. Dessa maneira, o método mostrou-se relativamente simples e, aliado às variações observadas a nível de gênero, poderá tornar-se importante para a biotipagem de fungos oportunistas. Para a *C. albicans*, a eletroforese em uma dimensão somente, mostrou o aparecimento de 5 distintos grupos cromossômicos que apresentaram mobilidade pelo tamanho. Pelo menos 4 das 5 primeiras bandas, contém um mínimo de 2 fragmentos de DNA de tamanhos similares, que eram separados pela segunda dimensão. Os estudos demonstraram ainda que os cromossomos parecem migrar intactos. Além disso, as cepas parecem ser diplóides.

MAGEE¹⁴¹ *et alii* (1988), usando as técnicas da eletroforese em campo ortogonal, de inversão de campo e de campo homogêneo, conseguiram determinar 11 bandas cromossômicas em cepas da levedura *C. albicans*. A eletroforese de campo ortogonal, resolveu melhor os cromossomos pequenos, enquanto que a de inversão de campo, em virtude de inverter o campo de corrida, resolveu melhor os maiores. A de campo homogêneo teve desempenho semelhante mas, não conseguiu resolver os homólogos, que marcavam na mesma banda. As cepas analisadas demonstraram grande polimorfismo para o tamanho dos cromossomos. Desse modo, os autores sugerem que a *C. albicans* apresenta 7 cromossomos, tendo em vista que gens puderam ser encontrados nos 7 cromossomos. Dois cromossomos identificados geneticamente, puderam ser localizados no cariótipo eletroforético.

JOHNSTON¹⁰³ *et al.* (1988), estudaram o cariótipo de cepas de leveduras de vários gêneros, pela eletroforese de inversão de campo. Essa técnica foi empregada para revelar os cromossomos grandes (> 1000Kb) presentes na *S. kluyveri* e em vários outros gêneros de leveduras, estabelecendo mais acuradamente seus respectivos padrões de cariótipo eletroforético. Essa técnica também foi utilizada para demonstrar a presença de cromossomos compridos e polimórficos, em muitas das leveduras estudadas. Pela técnica do Southern blotting, estabeleceram os graus de relacionamento entre os gêneros estudados. *C. albicans* mostrou 4 bandas, correspondentes a um número mínimo de 5 cromossomos e *C. utilis* 1 banda, correspondente a 2 cromossomos.

STEENSMA²⁵⁰ *et al.* (1988), estudaram o cariótipo eletroforético obtido pela eletroforese de campo cruzado, na classificação das leveduras *Kluyveromices marxianus* e *K. lactis*. Verificaram que os cariótipos dessas duas leveduras apresentavam significativas diferenças, o que corrobora os estudos de autores que as classificavam como espécies diferentes. Estudaram também os híbridos entre essas duas espécies e não encontraram mudanças entre os seus gens.

MERZ¹⁵¹ *et al.* (1988), através de eletroforese em campo alternado, estudaram os isolados de *C. albicans*, observando o cariótipo eletroforético de suas moléculas de DNA. Foram encontradas de 7 a 9 bandas dos isolados obtidos de 17 pacientes, tendo-se ainda observado 14 padrões diferentes. Esses padrões podem ser utilizados para estudos epidemiológicos, uma vez que 2 pacientes, apresentavam o mesmo cariótipo, comprovando que a cepa deve ter sido transmitida de um para o outro no hospital em que ambos estavam internados. Os resultados obtidos evidenciaram que existe uma grande variação dos cariótipos eletroforéticos entre as leveduras desses pacientes. As bandas de DNA dessas leveduras, provavelmente eram maiores do que 1200 Kb, conforme as comparações com a *S. cerevisiae*. As bandas maiores parecem ter um tamanho de 1 a 2 megabases, conforme o resultado obtido também por outros pesquisadores. A separação eletroforética e a

identificação dos cromossomos dessa levedura, permitirão os estudos genéticos, o que até então não era possível. Essa técnica apresenta vantagens sobre outras técnicas para delinear as cepas dessas leveduras. Dentre elas, citaram o encontro de um alto grau de variabilidade entre as cepas isoladas dos diferentes pacientes. Outra vantagem é que esse procedimento pode ser feito com um único teste e não a bateria convencional de testes bioquímicos ou de reações de inibição. Dentre as desvantagens, citam que os equipamentos não são rotineiramente encontrados em laboratórios clínicos e, que existe um limite de cerca de 10 amostras aplicadas por gel, com o uso dos controles apropriados. Essa técnica permite a análise da organização cromossômica dessas leveduras a determinação dos grupos de *linkage* e a definição ou definição genética das cepas, que poderão ser estudadas epidemiologicamente.

MONOD¹⁵⁸ *et alii* (1990), identificaram as cepas patogênicas de leveduras, através da análise eletroforética de seus cromossomos. Salientaram que os estudos epidemiológicos requerem a caracterização das leveduras patogênicas pelo menos a nível de espécie. Estudaram 130 cepas isoladas de 4 espécies de leveduras do gênero *Candida*, separando-as pela eletroforese de campo cruzado. Cada espécie foi caracterizada pelo seu cariótipo distinto. Pequenas variações entre cepas da mesma espécie foram detectadas, mostrando serem úteis na sua caracterização. Mediante o estudo, os autores propõem um sistema para a cariotipagem desses microorganismos. Verificaram ainda que a morfotipagem dessas leveduras não correspondia aos achados da cariotipagem, demonstrando ser essa técnica, mais precisa na caracterização das cepas nos estudos epidemiológicos. As bandas mostraram resolução entre 500 e 3000 Kb. Cepas com os mesmos padrões de bandas, foram isoladas de regiões diferentes de um mesmo organismo.

SMITH²⁴³ *et al.* (1990), compararam eletroforeticamete as enzimas e a homologia do DNA-DNA de várias espécies de *Dekkerae*, *Brettanomyces* e *Eeniella*, com finalidades taxonômicas. Os estudos indicaram que 2 cepas de *Dekkerae* 4 de *Brettanomyces* podiam ser reconhecidas como muito

relacionadas. Confeccionaram a matriz de similaridade entre as espécies, baseando-se nos seus respectivos valores de Rm.

MILLS & MCCLUSKEY¹⁵⁶ (1990), estudaram os cariótipos eletroforéticos dos fungos: a nova citologia. Salientam que a eletroforese em gel de campo cruzado pode ser eficientemente usada para separar DNAs de alto peso molecular em matrizes de agarose, constituindo-se num método rápido e eficiente na análise dos cariótipos dos fungos, no estudo da organização dos genomas e dos linkages e, na construção da mapa genômico. As modificações da técnica servem para resolver melhor os cromossomos fúngicos, estimados possuir 12.000 Kb de comprimento. A nova geração de sistemas promete resolver os cromossomos maiores. Essa nova tecnologia, aliada aos procedimentos de padronização para a análise do DNA, pode prover um eficiente método de análise genética. Além disso, a descoberta de que a eletroforese cromossômica pode ser feita diretamente das células leveduriformes, dos esporos e dos micélios poderá trazer avanços para a técnica da pesquisa genética molecular dos fungos, mesmo coletando-os da superfície dos meios de cultura. Reporta os trabalhos de Magee *et al.* (1988) e Wilkins (1986), que determinaram que a *C. albicans* possui 7 cromossomos de comprimento entre 1100 e 3000 kb.

RUSTCHENCO-BULGAC²²⁰ (1991), estudou as variações dos cariótipos eletroforéticos em *Candida albicans*, por meio da técnica do OFAGE (eletroforese em gel com alteração ortogonal do campo). Verificou que a técnica permitiu a diferenciação de cepas mutantes, determinando as mutações espontâneas que ocorriam nos laboratórios.

WICKES²⁸⁴ *et alii* (1991), estudaram o mapa físico e genético da *C. albicans*, através da análise eletroforética (em campo cruzado) de seus cariótipos. Confirmaram os estudos de Lasker *et al.* (1989), segundo o qual elas possuíam 8 cromossomos.

VANCANNEYT²⁷⁶ *et alii* (1991), conseguiram diferenciar espécies de leveduras, baseando-se nos padrões eletroforéticos de suas proteínas totais. Realizaram a eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida de isolados

totais de 112 cepas de 20 diferentes espécies de leveduras, muitas delas pertencendo ao gênero *Candida*. Os resultados foram comparados por análise numérica. A técnica permitiu avaliar relações taxonômicas a nível de espécie. Diferenças qualitativas entre os eletroforetogramas proteicos das diferentes espécies, confirmaram as relações anamórficas/telemórficas e conseguiram detectar as similitudes entre as espécies. A alta reprodutibilidade mostrou ser possível avaliar diferenças quantitativas a nível intraespecífico. As relações inter e intragenéricas, puderam ser deduzidas após a comparação com outros critérios taxonômicos. A construção de um banco de dados com os padrões eletroforéticos encontrados foi feita e, poderá ser utilizada para a identificação rotineira das leveduras. Para as leveduras do gênero *Candida*, foram propostas técnicas como a ressonância magnética protônica, que mostra os espectros dos polissacarídeos e de suas mananas e manoses; a análise das proteínas por eletroforese; os estudos inumoeletroforéticos dos antígenos; os padrões das bandas de DNA cromossomal, e a análise das cadeias longas de ácidos graxos. A eletroforese de alta resolução, combinada com a análise por computador dos padrões eletroforéticos das proteínas, mostrou o seu sucesso na classificação de bactérias. As células leveduriformes foram cultivadas em meio sólido e depois repicadas para meio líquido, onde se desenvolveram por 2 dias em shaking a 28°C e depois lavadas por 3 vezes com PBSNa. Os extratos foram obtidos por sonicação em gelo por 3 minutos e depois da adição de SDS, foram fervidos por 10', centrifugados e estocados a - 80°C. Descobriram que independentemente do tipo de crescimento leveduriforme, os resultados obtidos eram aproximadamente os mesmos, fazendo com que a técnica seja bastante reprodutível. As leveduras devem ser cultivadas em fase logarítmica porque se estiverem na fase estacionária, padrões proteicos difusos poderão aparecer, em virtude da degradação de proteínas de alto peso molecular e do acúmulo de proteínas ou de peptídeos de baixo peso molecular na placa da eletroforese. O mesmo ocorreu com as células que cresceram em meio sólido. A técnica do PAGE-SDS pode ser utilizada para verificar a autenticidade de cepas em coleções de culturas, tendo os autores detectado

uma cultura errada numa das cepas cedidas. As diferenças intraespecíficas são quantitativas e em alguns casos, foram feitas correlações com os locais ecológicos de suas origens.

TÖROK & KING JR.²⁶⁷ (1991), fizeram um estudo comparativo assim como a identificação das leveduras causadoras de contaminações nos alimentos. Fizeram inicialmente um estudo morfológico das colônias que foram isoladas de frutas e vegetais processados. Identificaram 239 cepas, que foram identificadas pelos kits comerciais (API 20C e API Yeast-ident). As leveduras que contaminavam as frutas, representavam 36 espécies pertencendo a 19 gêneros e, as dos vegetais, 34 espécies de 17 gêneros. Em 80% dos casos, os métodos convencionais e simplificados de análise, conseguiram identificar as cepas. Os kits comerciais mostraram ser fáceis de usar mas, inapropriados para a pesquisa das leveduras que contaminam alimentos. A identificação pelo computador mostrou-se útil. Dentre as leveduras do gênero *Candida*, citaram as seguintes espécies: *C. viferrii*, *C. folliculosa*, *C. diversa*, *C. famata*, *C. haemulonii*, *C. humicola*, *C. intermedia*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. magnoliae*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. tropicalis* e *C. versatilis*.

VAN DER WESTHUIZEN & PRETORIUS²⁷⁴ (1992), estudaram o valor da impressão eletroforética e da cariotipagem de leveduras produtoras de vinho, nos programas de melhoramento dessas cepas. Verificaram que as técnicas que utilizavam proteínas totais solúveis, os fragmentos de DNA de restrição e os fragmentos cromossômicos do DNA da levedura *Saccharomyces cerevisiae* conseguiram distinguir 10 cepas produtoras de vinho. Essas técnicas permitiram com isso, um maior controle industrial do processo, identificando os híbridos que pudessem eventualmente aumentar a produção. Os extratos foram obtidos segundo a técnica de Van Vuuren & Van der Meer (1987) e estocados a -18°C. A concentração de proteínas foi feita pelo método de Folin-Lowry, descrito por Plummer em 1971 e as amostras foram ajustadas a 2 mg/ml com um tampão tris de 6,4mM. Correram a eletroforese em gel de corrida a 7% e empacotador a 5%. Realizaram a preparação do DNA

cromossômico intacto e utilizaram a eletroforese em campo cruzado para a identificação das bandas.

TOROK²⁶⁶ *et alii* (1992), estudaram a cariotipagem de leveduras através do uso do southern blotting para estudar os cromossomos de células totais. Utilizaram para tanto a técnica da eletroforese em gel de campo elétrico homogêneo para separar os DNAs de cromossomos intactos de diferentes espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. Verificaram que várias cepas apresentavam bandas cromossômicas semelhantes e que algumas diferenças em bandas individuais indicavam polimorfismo cromossômico cepa-específico, o que era comum nesses microorganismos. A eletroforese em gel é amplamente utilizada para separar biologicamente as macromoléculas, tendo por base o seu tamanho, carga elétrica e conformação. A técnica mostrou-se poderosa para estudar o cariótipo dos eucariotas inferiores.

JANATOVA¹⁰¹ (1992), verificou a existência de um diplóide de *C. boidinii*, através da técnica que media o seu conteúdo do DNA.

Em 1993, DEL CASTILHO⁵⁰ *et al.* criaram um novo método para caracterizar taxonomicamente a *Candida albicans*, através da análise das seqüências não espécie-específicas dos seus respectivos DNAs. Por outro lado, TRINEL²⁶⁹ *et alii* (1993), isolaram e caracterizaram antígenos de *Candida albicans* pelo western blot, em géis de poliacrilamida, sem o uso de S.D.S.

TÖROK²⁶⁸ *et alii* (1993) e VASQUEZ²⁷⁷ *et alii* (1993) compararam métodos de análise por cariotipagem eletroforética e de restrição enzimática de várias espécies de leveduras indicando sua importância para estudos epidemiológicos e o aparecimento de intenso (polimorfismo) cromossômico cepa-específico entre essas leveduras, em virtude das muitas variações das bandas.

DOI^{53,54} *et alii* (1994) reportaram vários cariótipos eletroforéticos de *Candida albicans* isoladas de pacientes hospitalizados. Salientaram que esses cariótipos referiam-se aos padrões dos cromossômicos dos DNAs que foram separados pela eletroforese em gel de Campo Cruzado. Encontraram

cariótipos típicos e atípicos não se encontrando contudo relações com fontes de contaminação hospitalar.

KURTZMAN¹¹⁸ (1994) também reportou a taxonomia molecular das leveduras, com o uso de técnicas de eletroforese como instrumentos de pesquisa.

Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm reportado o uso de técnicas de eletroforese em géis de poliacrilamida, no estudo de proteínas e enzimas de parasitas (MELONI¹⁴⁹ *et al.* 1995), bactérias (MONTILLA¹⁶⁰ *et alii.* 1995) enzimas em múmias (KAN¹¹³ *et alii.* 1994) simbiotas intracelulares de insetos de arroz (NODA e KAWAHARA¹⁷⁵ (1995) e leveduras isoladas de carnes embutidas (McCARTHY e DAMOGLON,¹⁴⁷ 1996), tendo comprovado a eficácia e rapidez da metodologia além de sua ampla utilização nos procedimentos de pesquisa e estudos clínicos e industriais.

2.5.1.2. Técnicas moleculares diversas utilizadas na identificação de microorganismos e leveduras do gênero *Candida*

Em 1974, MILLER¹⁵⁵ *et alii.* identificaram rapidamente a *C. albicans* em pacientes que apresentavam septicemia, através da técnica da cromatografia líquido-gasosa. Essa técnica foi usada para o estudo do soro de pacientes normais e o soro de pacientes com septicemia tanto por bactérias, como por fungos. Verificaram que os cromatogramas dos soros de pacientes com septicemia bacteriana eram indistinguíveis dos daqueles pacientes com soro normal (sem doença), enquanto que os cromatogramas de pacientes com septicemias por fungos (especialmente por leveduras do gênero *Candida*), apresentavam picos anormais, sugerindo ser a técnica útil para a identificação rápida dessas leveduras, bem como na identificação de produtos tóxicos sistêmicos oriundos desses microorganismos.

LEE¹²⁴ *et alii* (1993), reportam uma nova classificação para *Candida apis* var. *galacta*: *Candida galacta* comb. nov. levando em conta os estudos da

composição das bases de seu DNA, sistema ubiquinona e composição de ácidos graxos de suas células.

SCHULZ²²⁹ *et alii* (1993), com o intuito de estudar as relações evolucionárias da bactéria que ataca as uvas do vinho (*Agrobacterium vitis*), analisaram seus genomas bacterianos pela tipagem de seus DNAs com o uso de enzimas de restrição e separação posterior pela eletroforese em campo cruzado.

NAKASE¹⁶⁴ *et alii* (1994), determinaram uma nova espécie de levedura, a *Candida sojae*, através de técnicas de DNA-DNA, %mol G+C, padrões eletroforéticos de suas enzimas e ressonância magnética protônica das mananas de sua parede celular.

HOMMEL⁹⁸ *et al.* (1994), trataram *C. apicola* e *C. bombicola* com N-metil-N-nitro-N-nitroso guanidina e obtiveram a formação de mutantes auxotróficos e mutantes citocromo-oxidase negativos. A deficiência de citocromo-oxidase intacta, não alterou a habilidade de produção de sorbose lipídica. Isso indicou que o sistema de produção de energia da mitocôndria permaneceu intacto e que não dependeu necessariamente da produção de sorbose lipídica extracelular pelas leveduras desse gênero.

VAN BELKUM²⁷³ *et alii* (1994), reportaram o uso da técnica do PCR na genotipagem de cepas de *C. albicans* em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea. Os 11 pacientes pesquisados possuíam leucemia e foram colonizados pela mesma cepa durante os 5 meses do experimento, recebendo ainda o tratamento antimicótico adequado. A técnica do PCR mostrou poder identificar separadamente todas as cepas pesquisadas, não sendo observadas contaminações de um paciente para outro. A técnica mostrou-se útil na análise epidemiológica e na avaliação da higiene hospitalar. As cepas de leveduras foram mantidas em estoque e depois semeadas em meio sólido, sendo incubadas a 37°C/60 horas. Quando o tamanho das colônias atingia 4 a 5mm de diâmetro, uma simples colônia era pescada e ressuspensa em 100 µl do tampão dissociante que continha zimolase. Os

esferoplastos eram preparados após lise com tampão de isotiocianato de guanidina e celite.

ECHEVERRIGARAY⁵⁹ *et alii* (1994), estudaram com o uso de sondas mini-satélites, o DNA das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*. Observaram alto polimorfismo nas comparações intra e interespecíficas, conseguindo identificar todas as cepas estudadas, ainda que estreitamente relacionadas.

CHRYSSANTHOU⁴⁰ *et alii* (1994), detectaram o DNA da levedura *C. albicans* no soro, através da técnica do PCR, com o intuito de fazer o diagnóstico de candidose disseminada. O uso de 2 pares de primers, aumentou a sua sensibilidade. Eles conseguiram detectar o DNA dessa levedura no soro, em amostras teciduais de camundongos infectados experimentalmente, assim como no soro de pacientes com candidemia e pacientes com infecção profunda pela levedura. O método do PCR mostrou-se mais sensível do que as culturas, nos dois experimentos com os animais, e também no caso dos humanos, dando melhores resultados com os de candidemia. O menor tempo de realização do teste do PCR, se comparado com a cultura, sua sensibilidade, assim como a possibilidade do uso de amostras de soro para análise, foram responsáveis pela maneira mais eficaz do diagnóstico da candidose sistêmica e da candidemia.

BÖHLER²⁰ *et alii* (1994), realizaram um estudo imunohistoquímico in vivo e in vitro de leveduras do gênero *Candida* recobertas por IgA, obtidas de pacientes com candidíase vulvovaginal. O objetivo era avaliar a deficiência quali e quantitativa de IgA nas secreções cervicovaginais desses pacientes e se essa deficiência podia ser medida de alguma forma. Os resultados não mostraram diferenças significativas nos níveis séricos e cervicovaginais da IgA. Nas leveduras obtidas de secreções cervicovaginais, a IgA recobria a superfície de suas células. Concluíram que a candidíase vulvovaginal recorrente não podia ser atribuída a uma deficiência de IgA. Em alguns casos, parece ter havido uma deficiência na capacidade das células leveduriformes

recobrirem-se pela IgA. A inativação da molécula de IgA pelas proteases dessas leveduras parece ter uma importância na sua patogenicidade.

WHITE²⁸² *et alii* (1994), realizaram a caracterização rápida da *C. albicans* através da espectrofotometria de massa por pirólise. Compararam o resultado dessa pesquisa de 41 isolamentos clínicos dessa levedura, com os métodos da morfotipagem e da resistotipagem. Os dois sistemas foram aptos a separar entre essas leveduras, duas cepas diferentes, de *C. tropicalis* e de *C. glabrata*. Esses resultados indicaram ainda a possibilidade de reação cruzada de uma cepa. Por várias vezes a mesma cepa foi encontrada em diferentes regiões de um mesmo hospedeiro. A técnica foi rápida, simples, objetiva e capaz de discriminar as cepas de leveduras pesquisadas, comparando-se com as outras técnicas usadas.

TOLLEY²⁶⁵ *et alii* (1994), analisaram pela cristalização e difração de raios-X, a fosfomanose-isomerase da *C. albicans*. Essa enzima desempenha papel na biossíntese da manana, componente da parede celular da levedura.

SRIKANTHA²⁴⁹ *et alii* (1994), estudaram a sequência parcial do nucleotídeo de um RNA ribossômico simples e a estrutura secundária de uma grande subunidade de RNAr de 25S, da *C. albicans*. Os estudos de cariotipagem do genoma diplóide dessa levedura, foram feitos pela eletroforese em campo cruzado e demonstraram haver alta frequência de reorganização cromossômica.

SCHRÖPPEL²²⁸ *et alii* (1994), estudaram a evolução e a substituição das cepas de *C. albicans* durante a vaginite recorrente, demonstrada pela tipagem do DNA. Verificaram que a cepa que reinfectou a paciente, apresentou uma transição genética parecendo ser procedente da cavidade oral do parceiro homem da paciente. Esses resultados demonstram que as cepas infectantes da candidíase recorrente, não são geneticamente estáveis e que o tratamento medicamentoso pode resultar na seleção de variantes da cepa anteriormente infectante ou substituí-las por uma cepa geneticamente diferente e que o parceiro pode ser a fonte dessa cepa substitutiva.

LEE¹²³ *et al.* (1994), utilizando-se de técnicas da quimiotaxonomia, dos sistema de ubiquinona, da análise da composição do DNA e do cariótipo eletroforético, conseguiram comprovar que as espécies *C. methanolophaga* e *C. succiphila*, além de *C. methylica* e *C. boidinii*, apresentam muitas semelhanças, devendo, portanto, serem consideradas como sinônimos, respectivamente. A eletroforese foi realizada pela técnica do campo cruzado.

MORHART¹⁶³ *et alii* (1994), avaliaram pela ELISA, os antígenos citoplasmáticos de cepas de *Candida* obtidas de pacientes neutropênicos com câncer. Os componentes da *C. albicans* obtidos, mostraram ser predominantemente proteínas com carboidratos associados (glicoproteínas). A desnaturação com a eletroforese em gel, revelou a presença de 5 bandas de proteínas, com pesos moleculares entre 36000 e 44000. A utilidade clínica do teste se deve ao fato dessas proteínas serem encontradas no soro de 89 amostras obtidas de 31 pacientes granulocitopênicos. A sensibilidade do teste foi de 82% e a especificidade de 100%. O teste demonstrou ser útil no diagnóstico de infecções invasivas por essas leveduras em pacientes neutropênicos cancerosos. A eletroforese foi realizada em géis de 4 e 10%, com 75 µg de proteínas / canaleta a 125 V.

CHATURVEDI³⁹ *et al.* (1994), estudaram as correlações entre a formação dos tubos germinativos e a expressão dos antígenos de superfície em *Candida albicans*. A extração das proteínas foi feita com 2-ME, que segundo os trabalhos citados pelos autores (de Casanova & Chaffin, 1990), removem as células leveduriformes intactas, uma grande variedade de proteínas e glicoproteínas, podendo tornar acessíveis outras proteínas. Os antígenos foram estudados depois pela imunofluorescência.

MAFFEI¹³⁷ *et alii* (1994), realizaram a tipagem genotípica de cepas de *Candida albicans* isoladas de gestantes com vaginite recorrente, através da técnica dos fragmentos de DNA clivados com enzima de restrição. Salientaram que a vulvovaginite recorrente nesses indivíduos, é um dos seus maiores problemas e, a falta de um sistema simples de tipagem para identificar corretamente as cepas, tem se constituído num entrave nos progressos do

conhecimento da epidemiologia e patogênese dessa micose. Para tanto, isolaram as pacientes com diagnóstico positivo de vulvovaginite, que foram devidamente tratadas, apresentando bons resultados. Nos casos recorrentes, as leveduras foram isoladas e as suas cepas tipadas genotipicamente, através do padrão de isolamento eletroforético de fragmentos de DNA, clivados com a enzima de restrição Eco RI. Dos 24 isolamentos de *Candida albicans*, 66,7% das amostras puderam ser classificadas no subgrupo IA e 33,3%, no subgrupo IB, não sendo encontradas variações nas amostras pareadas. Em todos os casos, a candidíase vaginal recorrente foi devida à persistência das cepas originais. Tal resultado pode indicar, que seja realizado um tratamento inicial mais prolongado nos casos dessas infecções, com o objetivo de se impedir a persistência das cepas. A maior incidência do subgrupo IA, não pode ser digno de maiores interpretações, porque esse mesmo grupo é encontrado em outros sítios anatômicos, como a boca e o ânus, onde também predominam. Por outro lado, SCHROPPEL²²⁸ et alii. (1994), também estudando as vaginites recorrentes por meio da impressão digital do DNA, demonstraram que as cepas infectantes da levedura *Candida albicans*, não eram geneticamente estáveis, podendo haver uma seleção de cepas variantes em virtude do tratamento medicamentoso, além do parceiro masculino da mulher poder funcionar como um reservatório da levedura.

WILLINGER^{288,289} et alii, (1994), realizaram uma análise epidemiológica de várias leveduras através da eletroforese de campo cruzado, tendo constatado que as leveduras encontradas nas mães, apresentavam as mesmas bandas eletroforéticas daquelas encontradas nas suas crianças, demonstrando com isso que as mães transmitiam-nas para as crianças durante o parto.

BETREMIEUX¹⁴ et alii (1994) reportaram também o uso da técnica da tipagem de DNA para caracterizar *Candida albicans* causadora de infecções em UTIs neonatais. Compararam 5 técnicas diferentes e verificaram que a morfotipagem a biotipagem pelo DNA conseguiram indicar que as mães contaminaram as crianças, causando sepse.

As técnicas de impressão digital do PCR, tem nos últimos anos, sido cada vez mais empregados, como demonstram os trabalhos de SCHONIAM²²⁷ *et al.* (1993), KAN¹¹³ (1993), MEYER¹⁵² *et alii* (1993), MAIWALD¹⁴³ *et al.* (1994), ROBERT²¹³ *et alii* (1995), WILLIAMS²⁸⁷ *et. alli* (1995). Em todos os casos os métodos utilizados mostraram-se bastante sensíveis para caracterizar as leveduras pesquisadas, encontrando diferenças marcantes entre as cepas que serviram inclusive para estudos e controle de qualidade industriais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Características das cepas utilizadas

3.1.1. Procedência

No presente trabalho, foram utilizadas doze amostras de leveduras do Gênero *Candida*, isoladas da cavidade bucal de pacientes provenientes da Clínica Odontológica, pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Mário Tsunezi Shimizu, conforme mostra o quadro 11:

Quadro 11. Relação das espécies e variedade de leveduras bucais utilizadas nos experimentos.

Amostras	Abreviação	Setor de Origem	Código do Setor de origem
1 - <i>Candida tropicalis</i>	C.t.	FOS.J.Campos	1-b
2 - <i>Candida tropicalis</i>	C.t.	FOS.J.Campos	FCF-430
3 - <i>Candida albicans</i>	C.a.	FOS.J.Campos	F-72
4 - <i>Candida albicans</i>	C.a.	FOS.J.Campos	E-37
5 - <i>Candida albicans</i>	C.a.	FOS.J.Campos	97-a
6 - <i>Candida albicans</i>	C.a.	FOS.J.Campos	17-b
7 - <i>Candida guilliermondii</i>	C.g.	FOS.J.Campos	FCF-152
8 - <i>Candida guilliermondii</i>	C.g.	FOS.J.Campos	FCF-405
9 - <i>Candida parapsilosis</i>	C.p.	FOS.J.Campos	21-c
10 - <i>Candida parapsilosis</i>	C.p.	FOS.J.Campos	7-a
11 - <i>Candida krusei</i>	C.k.	FOS.J.Campos	IM-90
12 - <i>Candida krusei</i>	C.k.	FOS.J.Campos	4-c

3.1.2. Manutenção das amostras:

As amostras foram mantidas, durante toda a realização do estudo, em duas coleções:

a) Na primeira, as amostras foram inoculadas em meio completo para leveduras (M.C.L.), de acordo com o estabelecido por NEDER¹⁶⁸ (1992), contendo uma mistura de peptona, extrato de levedura, fosfato dibásico de potássio, glicose, ágar e água destilada q.s.p., e mantidas em tubos de ensaio (13 x 100mm) com tampão de algodão hidrófilo e levadas à estufa a 37° C durante 24-72 horas para o desenvolvimento celular. Após o crescimento, os tubos da coleção foram mantidos à temperatura ambiente durante 30 dias, sendo posteriormente reinoculados para a manutenção das culturas.

b) Na outra coleção, as amostras foram mantidas em tubos de ensaio (13 x 100mm) com tampão de algodão hidrófilo contendo meio completo de leveduras (M.C.L.), nas mesmas condições das cepas anteriores, com a exceção de que foram mantidas após o crescimento sob temperatura controlada na estufa a 37° C e depois sob refrigeração a 4° C. As cepas assim conservadas, eram substituídas a cada 6 meses.

Periodicamente foram feitos (em ambos os processos usados), o controle de variabilidade das amostras, através da observação da morfologia celular e colonial (aspectos macro e microscópicos) e coloração de Gram.

3.1.3. Caracterização das amostras:

As doze amostras do trabalho foram previamente identificadas segundo as técnicas de rotina prescritas por LODDER & KREGER VAN RIJ¹³² (1970), envolvendo aspectos bioquímicos de fermentação e assimilação de carboidratos; crescimento em meio líquido; produção de clamidósporos; coloração de Gram, etc., originando as várias espécies citadas (Quadro 11).

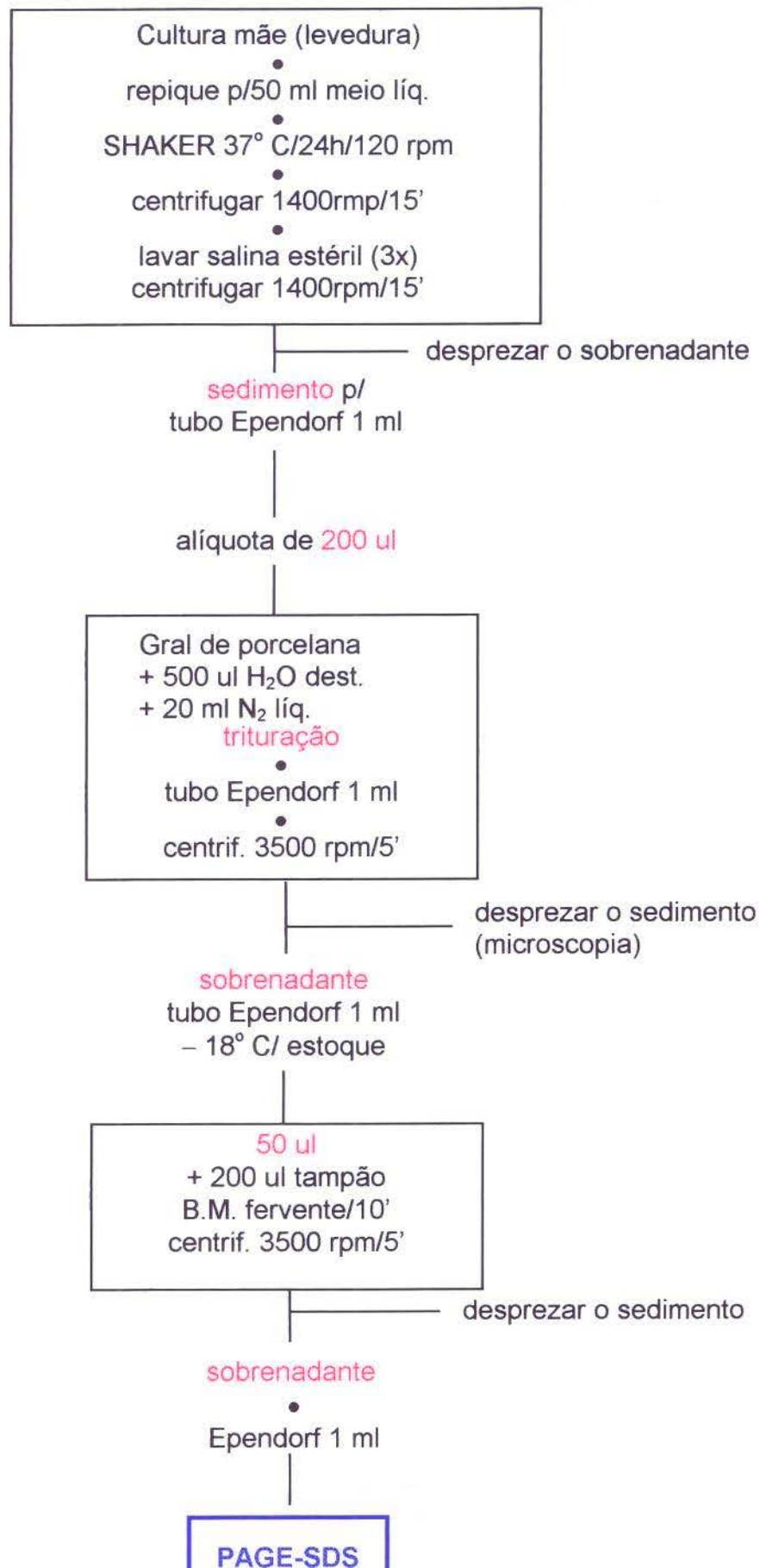
3.2. Método de preparo das amostras

3.2.1. Preparação do material para a extração das proteínas intracelulares

De cada amostra das leveduras mantidas conforme o item 3.1.2.a, foi retirada uma alíquota com o uso de alça de platina, e inoculada em frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml dos diversos meios de cultura usados, individualmente. Os frascos assim preparados (12), foram colocados em incubadora *Shaker* (Nova Técnica Instr. e Equip. Ltda.) e mantidos sob agitação constante (120 rotações por minuto) a 37°C, por 24 horas em aeração. Após o período de incubação, o conteúdo de cada frasco foi centrifugado a 1.400 rpm/5' (350 g) em centrífuga Fanem modelo 215 (Fanem Ind. e Comércio). Posteriormente o sobrenadante de cada tubo foi desprezado e os sedimentos foram lavados por 3 vezes com solução fisiológica estéril, a fim de se retirarem os *debris* celulares e restos dos meios de cultura, sendo centrifugados em cada passagem a 1.400 rpm/10' (350 g). Os materiais assim obtidos, foram mantidos em tubos tipo Ependorf de 1 ml e posteriormente submetidos à extração dos componentes intracelulares.

O esquema nº 1, a seguir, mostra resumidamente as etapas do método de preparo das amostras:

Esquema 1 - Método de preparo das amostras de leveduras do gênero *Candida* para extração de proteínas intracelulares.



3.2.2. Extração das proteínas dos componentes intracelulares pelo método da Criofratura celular em N₂ líquido, segundo HWANG⁹⁹ (1966) e tampão da amostra segundo BRUNEAU & GUINET²⁶ (1989):

Do conteúdo celular de cada tubo Ependorf preparado segundo o item anterior, foram retiradas alíquotas de 200 µl, as quais foram transferidas para um *Gral* de porcelana de 200 ml de capacidade, juntamente com 500 µl de água destilada estéril, adicionado de aproximadamente 20 ml de nitrogênio líquido (-196°), onde a massa celular era então congelada. Após a completa evaporação do nitrogênio líquido seguia-se a trituração do material, com duração de cerca de 3 minutos, aproximadamente. O material era então recolhido em um novo tubo, centrifugado a 3500 rpm (3000 g) por 5', (Centrífuga Centrim. - mod. 242 - marca Fanem) e o sobrenadante mantido a -18°C. Repetiu-se o procedimento com os diversos meios de cultura analisados: Meio Completo para Leveduras (M.C.L.); Bacto Sabouraud Maltose Agar (B.S.M.A.); Agar Sabouraud Dextrose (A.S.D.); Pagano Levin (P.L.); Agar Seletivo para Fungos (A.S.F.) e *Candida* BCG Agar Base (BCG).

O conteúdo celular do sedimento foi examinado microscopicamente antes e após o procedimento da extração, com o objetivo de se verificar a extensão da lise celular, observando-se que 90 a 100% do conteúdo das células leveduriformes sofreram disruptura. A cada 50 µl do sobrenadante assim obtido, adicionou-se 200 µl do tampão de amostras, segundo BRUNEAU & GUINET²⁶ (1989). A mistura, então obtida, era colocada em tubos, aquecida (Banho-Maria fervente por 10 minutos), centrifugada a 3500 rpm (3000 g) por 5 minutos e o sobrenadante mantido a -18°C até o momento da eletroforese.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

As amostras das culturas de leveduras, obtidas de acordo com a metodologia descrita anteriormente, foram analisadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (PAGE-

SDS), de acordo com DAVIS⁴⁹ (1964) e LAEMMLI¹²² (1970), com gel empilhador (*stacking gel*) a 4,5% e o gel separador (*running gel*) a 12,5%, em sistema de tampão descontínuo com 0,02M de Tris, 0,192M de glicina e 0,1% de SDS, a pH 8,3. O equipamento utilizado, incluindo cuba de acrílico, placas de vidro e a fonte elétrica, foi obtido da Técnica Permatrom, Ind. e Com. Ltda./SP. A eletroforese processou-se à temperatura ambiente, entre 21 e 23°C, em corrente constante de 150 V, posteriormente à uma pré-corrida a 75 V por aproximadamente 30 minutos, até que o marcador utilizado (azul de bromofenol), atingisse o final do gel (cerca de 5 horas).

Após a corrida eletroforética, o gel era então, retirado da placa e corado com Anazoleno sódico (*Coomassie Brilliant blue*) (OLIVEIRA,¹⁸⁵ 1995), a 0,1% por 12 horas e, posteriormente, lavado (descoloração) em solução descorante com metanol a 10% e ácido acético a 5%, também trocados por duas a três vezes.

As placas de eletroforese assim obtidas, eram mantidas em recipientes adequados, até que as fotografias sobre negatoscópio pudessem ser realizadas. Destaque-se que as placas de eletroforese não foram montadas em papel de celofane porque poderiam quebrar-se, perdendo-se o material. A desidratação, secagem e montagem das mesmas no papel celofane, segundo a técnica de JUANG¹¹¹ et al. (1984) somente foram feitas depois que todos os procedimentos foram realizados, a fim de serem arquivadas em definitivo.

Das placas assim obtidas, em seguida, procedeu-se à obtenção de suas mobilidades relativas (R_m), calculadas em função da proporção da distância percorrida pelas bandas em relação ao marcador azul de bromofenol, que indicava o início de cada corrida. Os resultados desses cálculos serviram de base para a confecção de diagramas em computador. Concomitantemente obteve-se os traçados densitométricos e as densitometrias de integralização da área dos géis de PAGE-SDS, com auxílio do densitômetro (Mod. 620/Biorad) e software I-D-Analyst (D.E.P.A.N./UNICAMP). Com os resultados (R_m) dos géis de eletroforese, elaborou-se dendrogramas (software NTSYS) indicativos das relações de afinidade filogenética entre as espécies analisadas.

4. RESULTADOS

Amostras de leveduras cultivadas nos diferentes meios de cultura e submetidas ao tratamento de extração das proteínas intracelulares pelo método da criofratura celular em nitrogênio líquido (HWANG,⁹⁹ 1966) em tampão solubilizante contendo 2-mercaptoetanol (segundo BRUNEAU & GUINET,²⁶ 1989), através de eletroforese (PAGE-SDS), permitiram a confecção de diagramas, gráficos de suas respectivas densitometrias de integralização da área e, ainda, dendrogramas indicativos da porcentagem de similaridade entre as diferentes cepas de leveduras do gênero *Candida* estudadas, conforme descritos anteriormente.

4.1. Resultados do perfil eletroforético em PAGE-SDS das proteínas intracelulares (Figs. 1 a 12) e respectivos diagramas representativos (Diagramas 1A a 12A) das diferentes amostras de leveduras submetidas a crescimentos nos diversos meios de cultura utilizados.

As amostras de leveduras do gênero *Candida*, caracterizadas e descritas no item 3.1.3 de Materiais e Métodos, representando *C. tropicalis* (2 cepas), *C. albicans* (4 cepas), *C. guilliermondii* (2 cepas), *C. parapsilosis* (2 cepas) e *C. krusei* (2 cepas), foram utilizadas para a obtenção de proteínas intracelulares (item 3.2.2 de Materiais e Métodos).

Os perfis eletroforéticos das proteínas obtidas podem ser observadas nas figuras de 1 a 12, representando nas 6 primeiras colunas as bandas detectadas no crescimento de cada cepa individualmente, para os meios de cultura:

- 1) Meio Completo para Leveduras — M.C.L.;
- 2) Bacto Sabouraud Maltose Agar — B.S.M.A.;
- 3) Agar Sabouraud Dextrose — A. S. D.;

- 4) Pagano Levin — P. L.;
- 5) Agar Seletivo para Fungos — A. S. F. e
- 6) *Candida* BCG Agar Base — B.C.G.

A 7ª coluna mostra o perfil de uma amostra de *Sacharomyces cerevisiae* conhecida e a 8ª coluna, o padrão biorad nº 161.0317, com substâncias de peso molecular conhecido, mostrando as bandas da lisozima (PM = 14.400), inibidor da tripsina (PM = 21.500), anidrase carbônica (PM = 31.000), ovoalbumina (PM = 45.000), albumina sérica (PM = 66.200) e fosforilase b (PM = 97.400). As bandas da aprotinina (PM = 6.500), da β -galactosidase (PM = 116.250) e da miosina (PM = 200.000), presentes no padrão usado não foram detectadas pelo gel empregado.

As Figuras de 1 a 12, resultantes da eletroforese, demonstram a presença de um número de bandas entre zero até 36, presentes nos respectivos "slots", individualmente. Ao lado das Figuras representativas das eletroforeses, encontram-se respectivamente os diagramas esquemáticos das mesmas (Figs. 1A a 12A).

Os diagramas 1A e 7A exibem o perfil da amostra de *Sacharomyces cerevisiae* cultivada no Meio Completo para Leveduras (M.C.L.), na coluna 7. As mesmas colunas dos diagramas 2A e 8A exibem o crescimento no Bacto Sabouraud Maltose Agar (B.S.M.A.). Os diagramas 3A e 9A, no Agar Sabouraud Dextrose (A.S.D.). Os diagramas 4A e 10A no Pagano Levin (P.L.). Os diagramas 5A e 11A e 6A e 12A, respectivamente, nos meios Agar Seletivo para Fungos (A.S.F.) e no meio *Candida* BCG Agar Base (BCG).

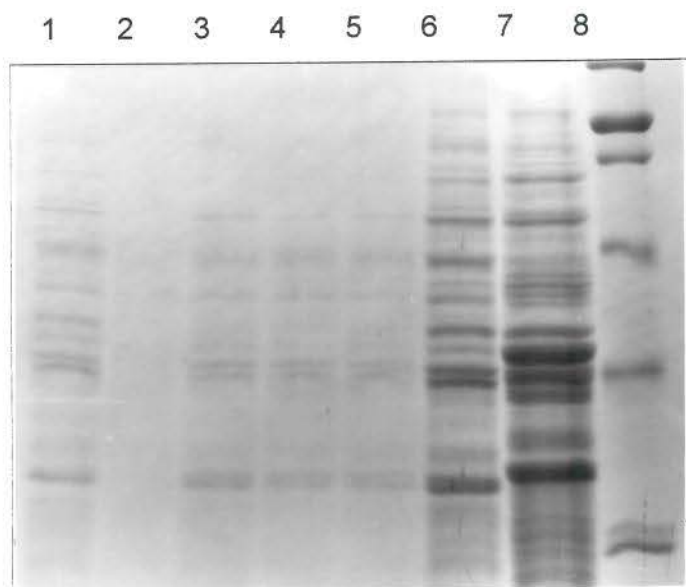


Figura 1. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 1-b de *Candida tropicalis* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

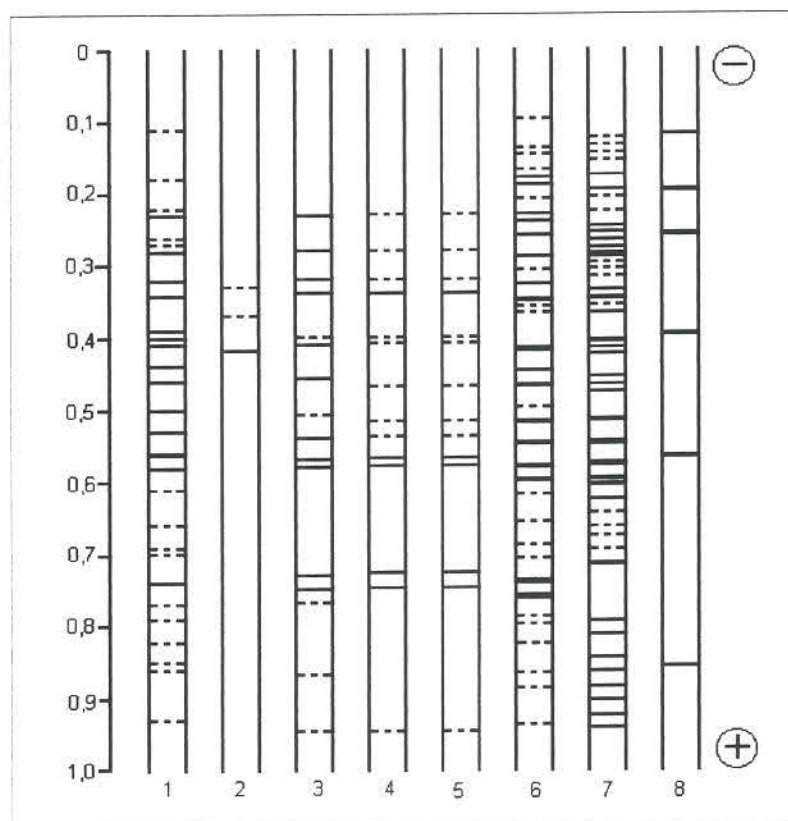


Figura 1.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 1-b de *C. tropicalis* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

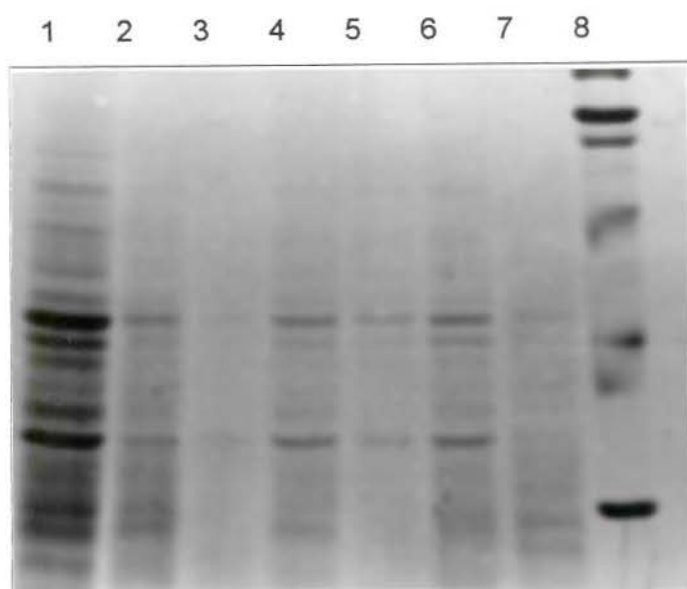


Figura 2. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-430 de *Candida tropicalis* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

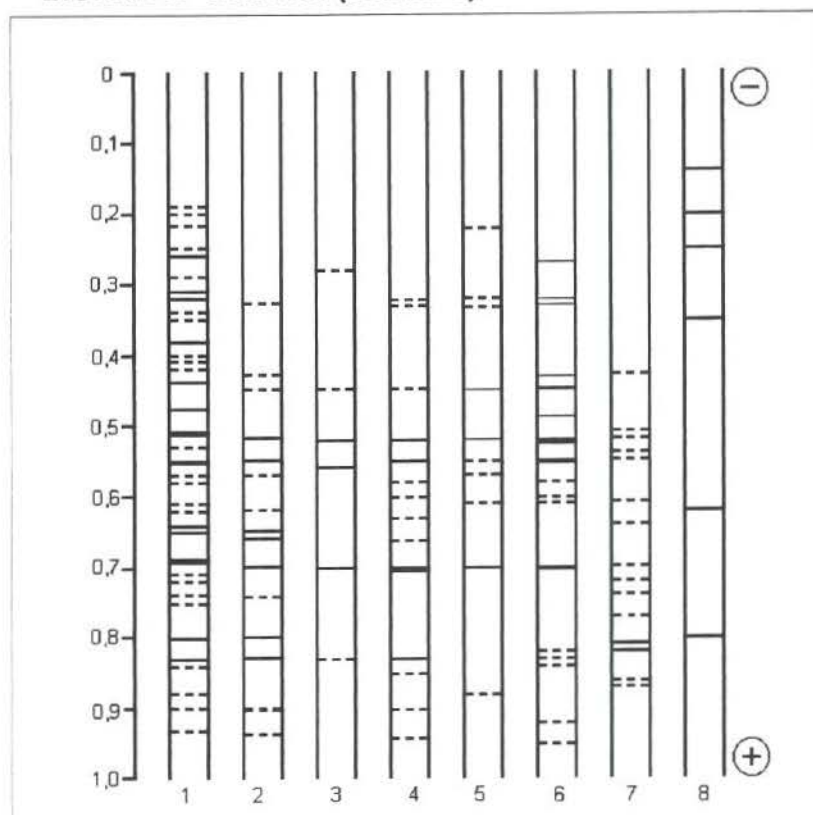


Figura 2.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-430 de *C. tropicalis* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

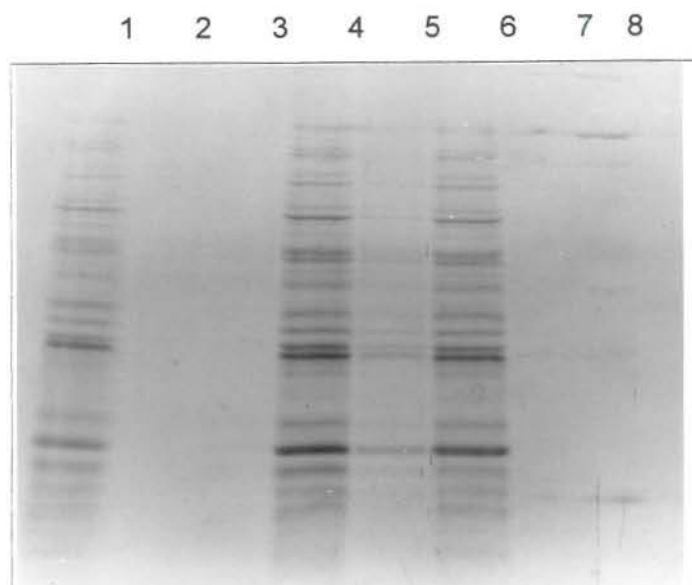


Figura 3. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra F-72 de *Candida albicans* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

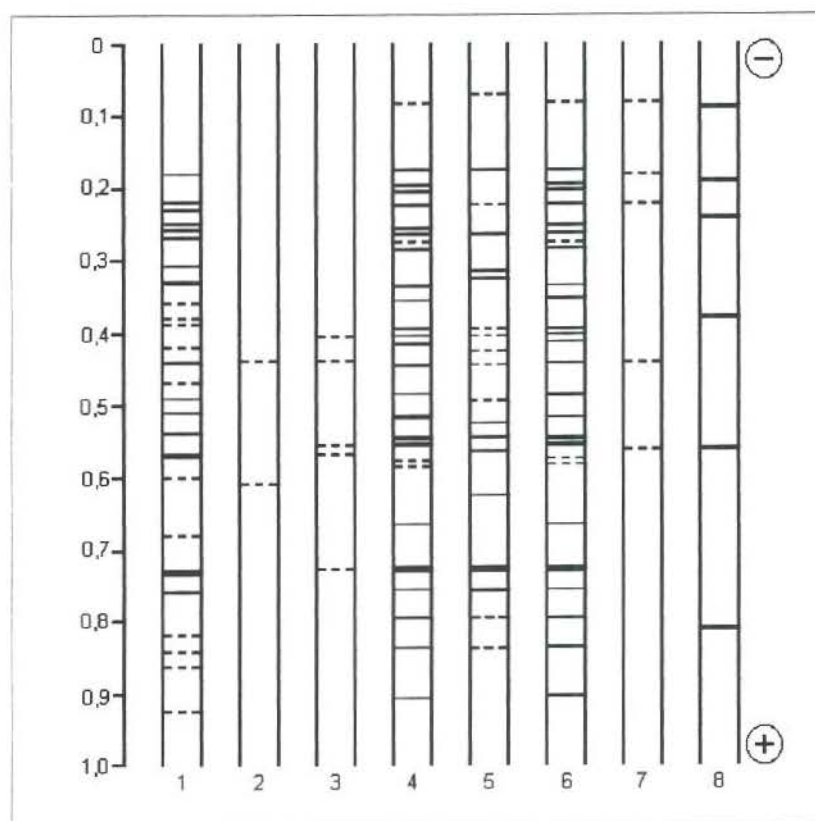


Figura 3.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra F-72 de *C. albicans* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

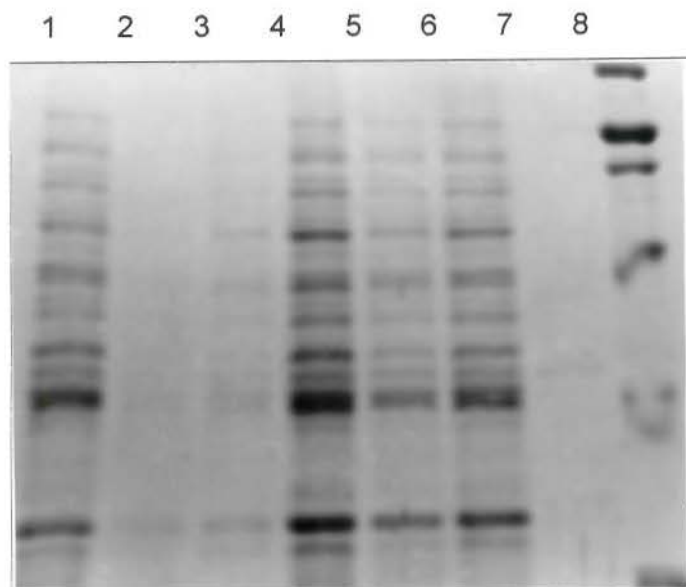


Figura 4. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra E-37 de *Candida albicans* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

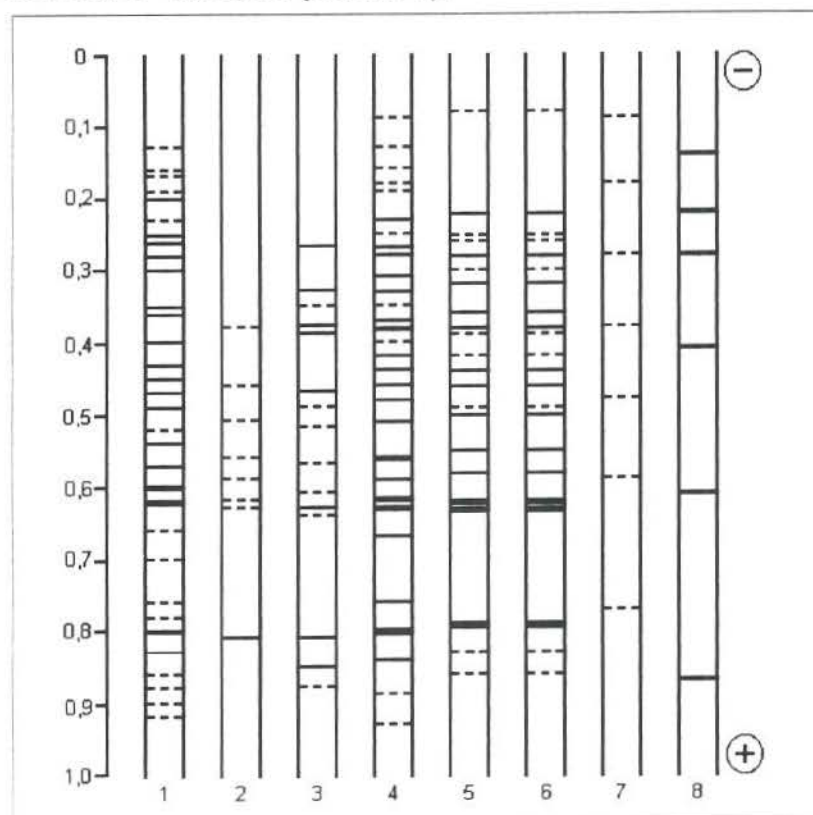


Figura 4.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra E-37 de *C. albicans* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

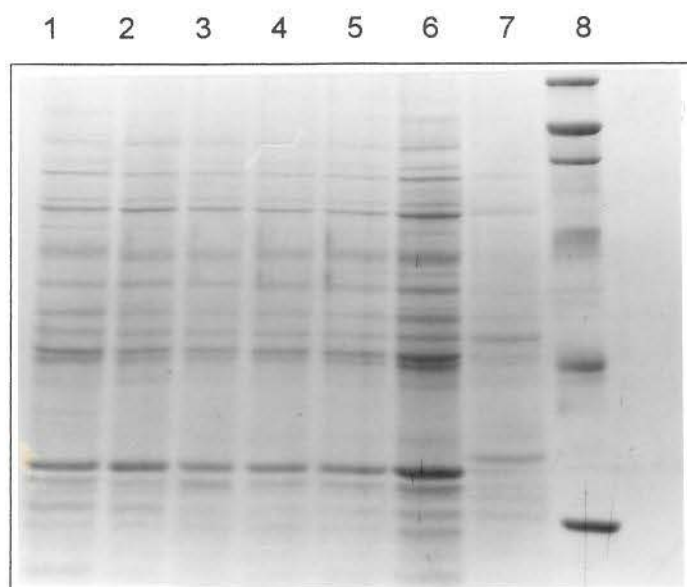


Figura 5. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 97-a de *Candida albicans* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

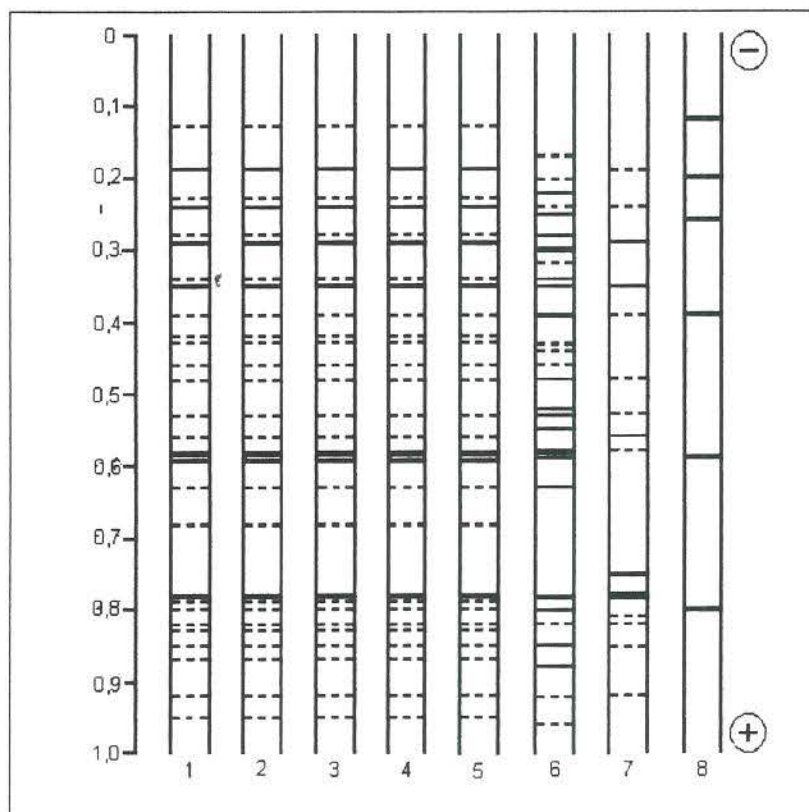


Figura 5.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 97-a de *C. albicans* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

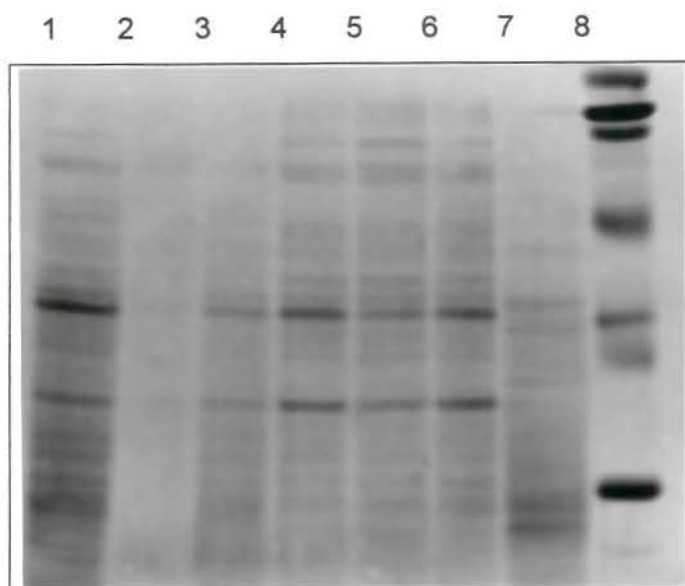


Figura 6. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 17-b de *Candida albicans* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

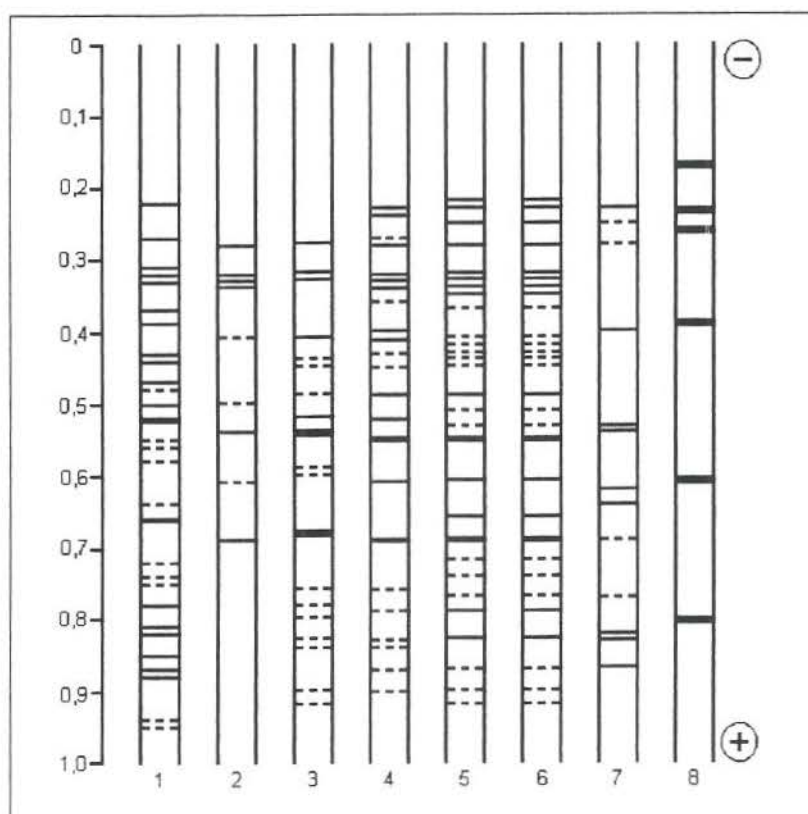


Figura 6.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 17-b de *C. albicans* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

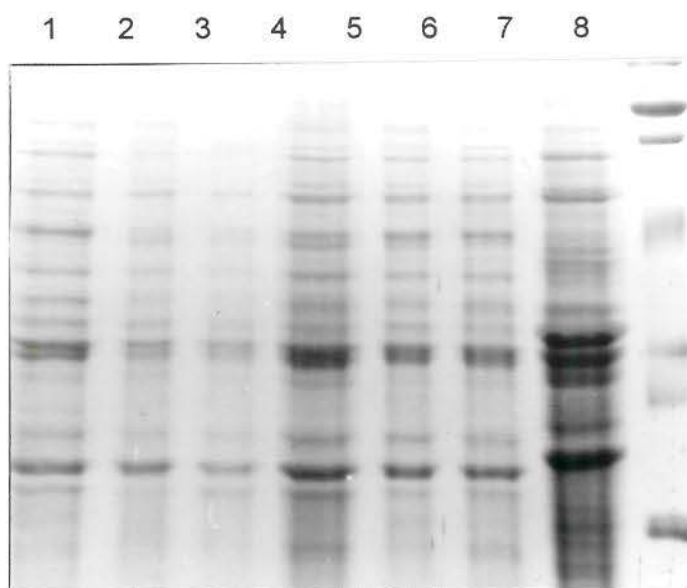


Figura 7. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-152 de *Candida guilliermondii* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

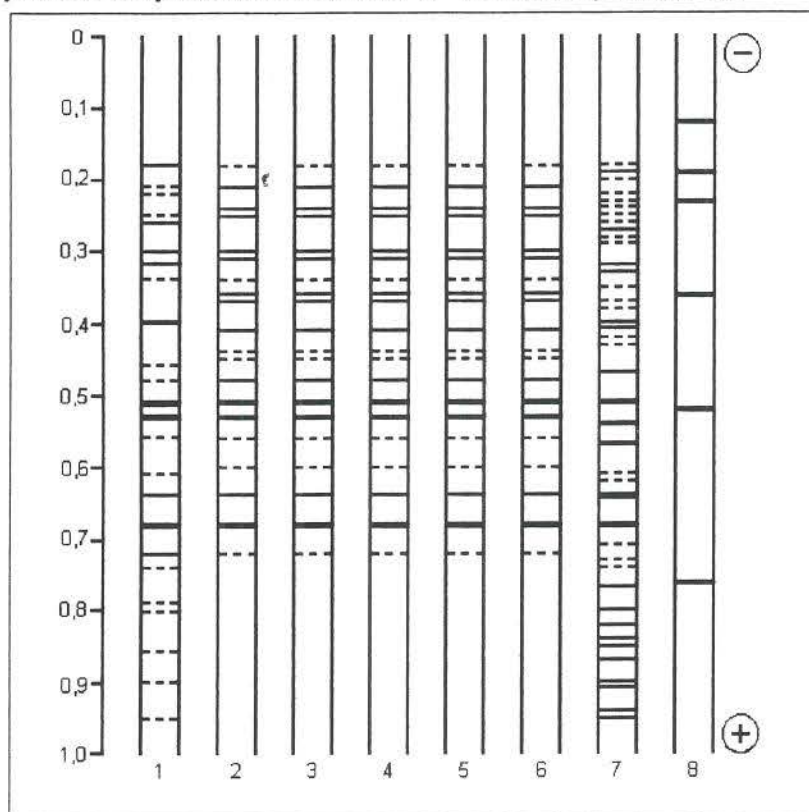


Figura 7.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-152 de *C. guilliermondii* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

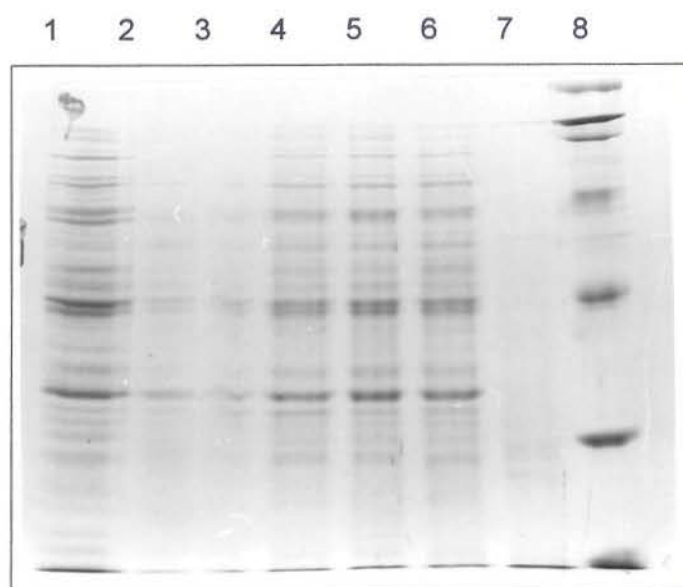


Figura 8. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-405 de *Candida guilliermondii* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

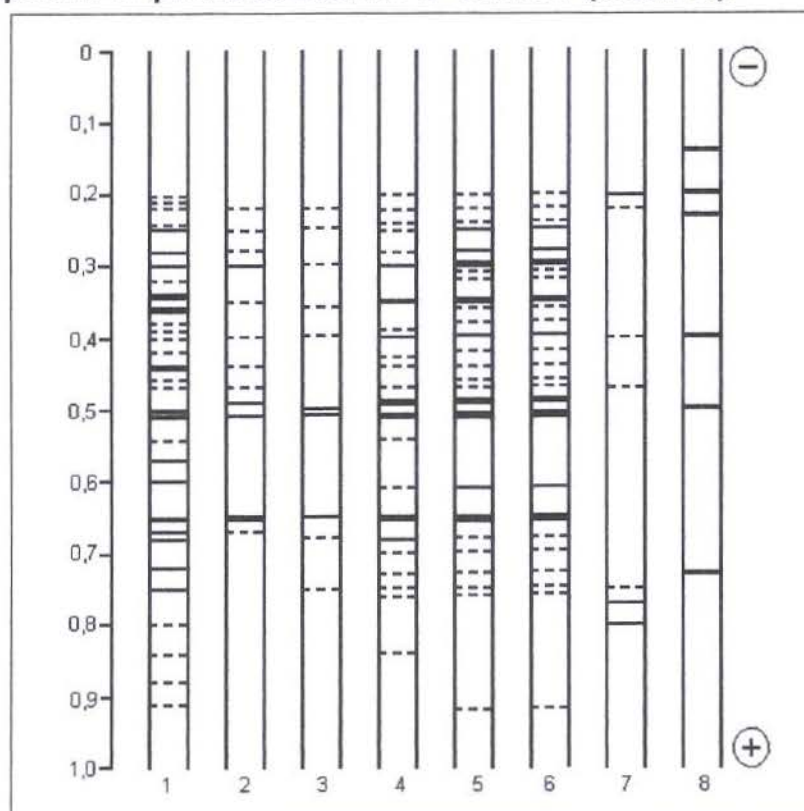


Figura 8.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra FCF-405 de *C. guilliermondii* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

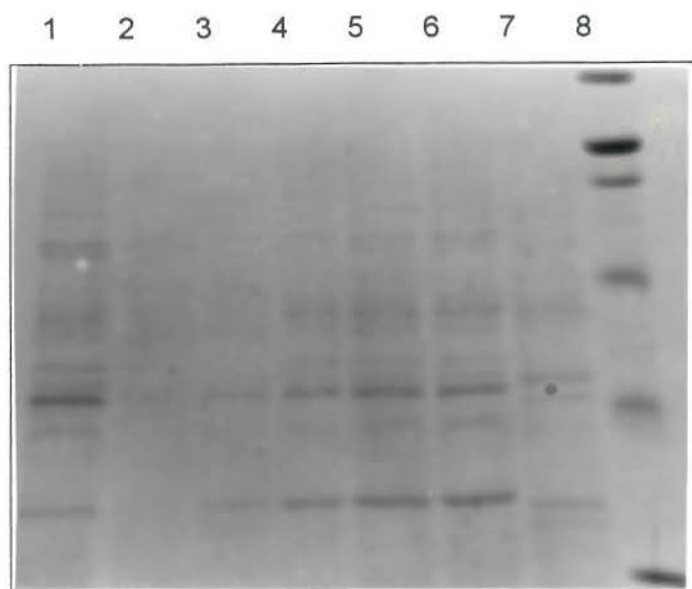


Figura 9. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 21-c de *Candida parapsilosis* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

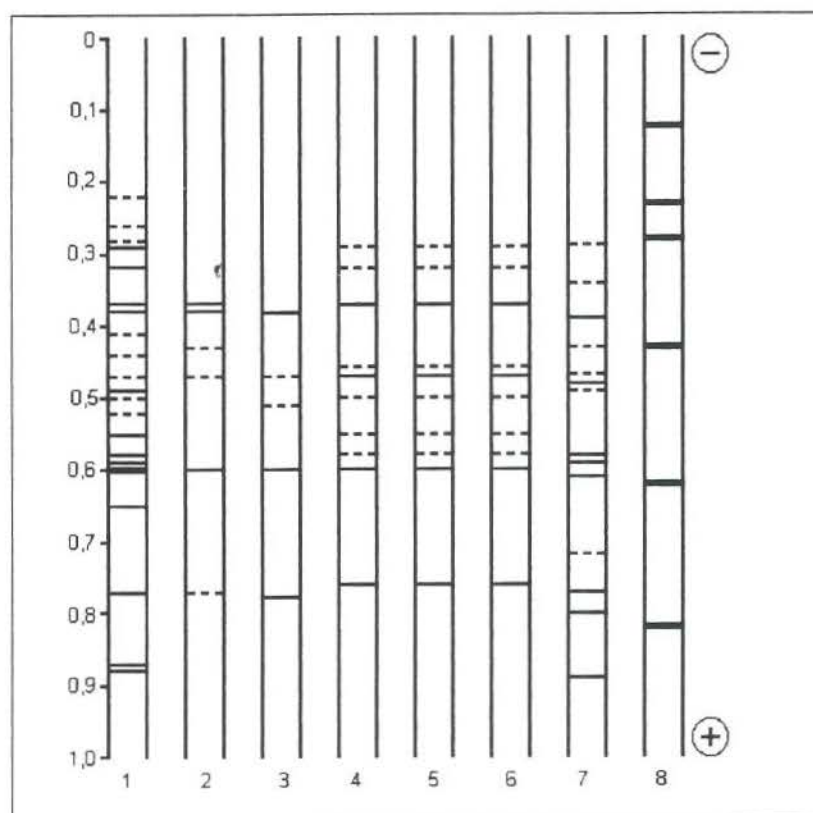


Figura 9.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 21-c de *C. parapsilosis* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

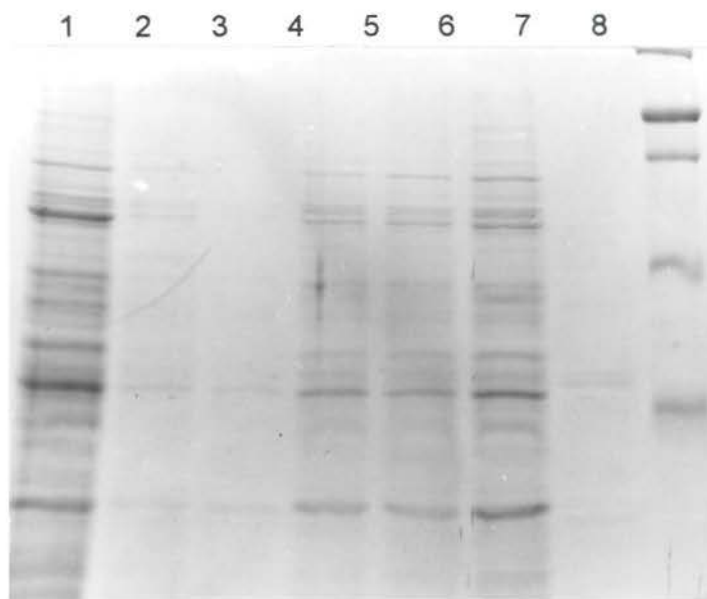


Figura 10. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 7-a de *Candida parapsilosis* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

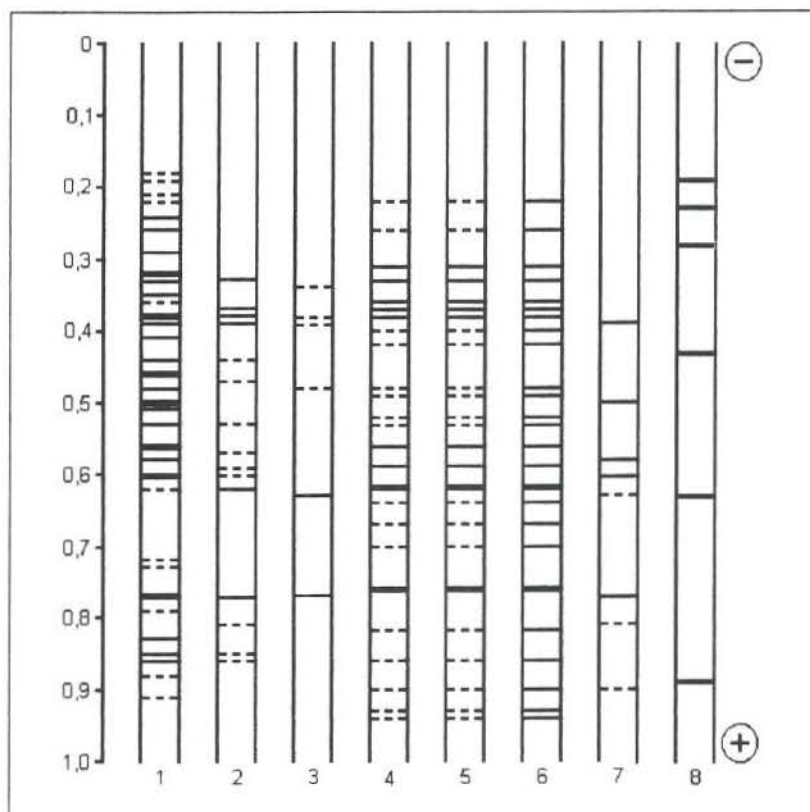


Figura 10.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 7-a de *C. parapsilosis* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

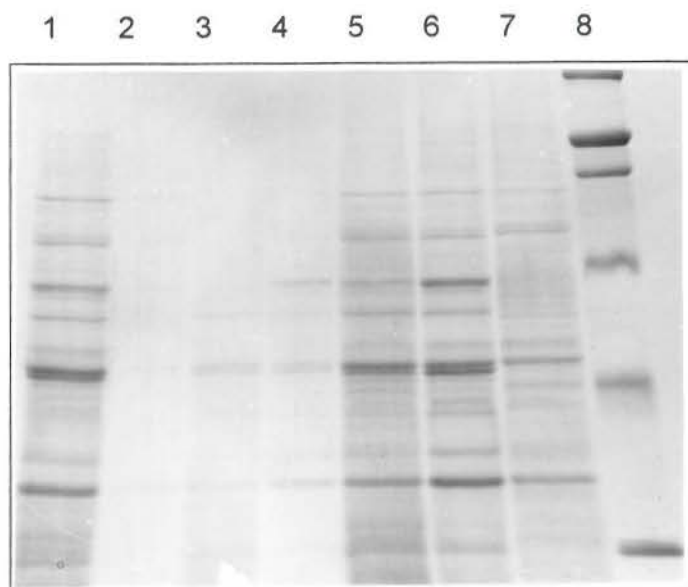


Figura 11. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra IM-90 de *Candida krusei* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

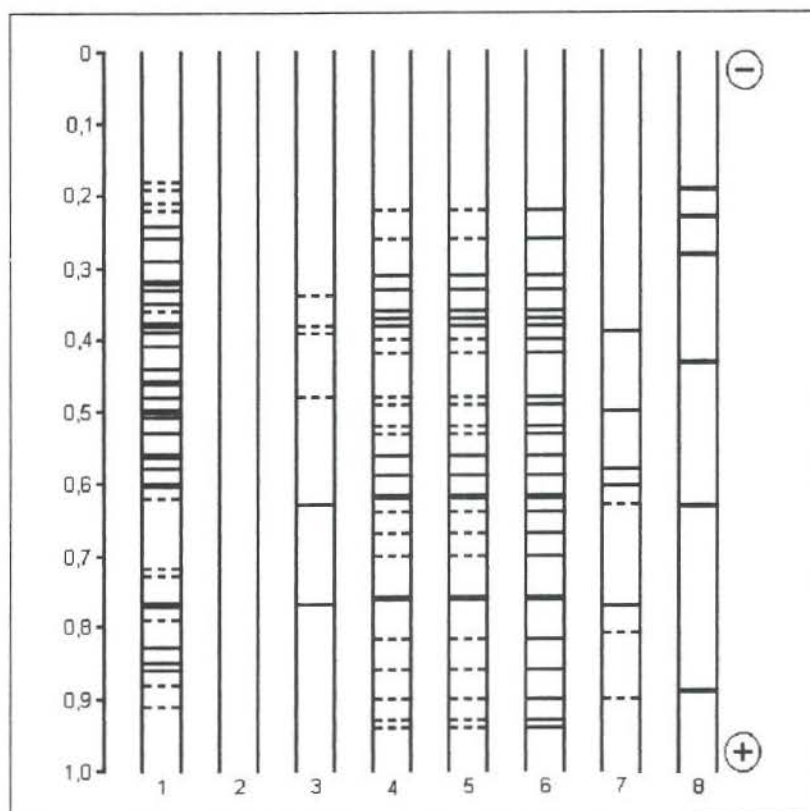


Figura 11.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra IM-90 de *C. krusei* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD nº 161.0317 (coluna 8).

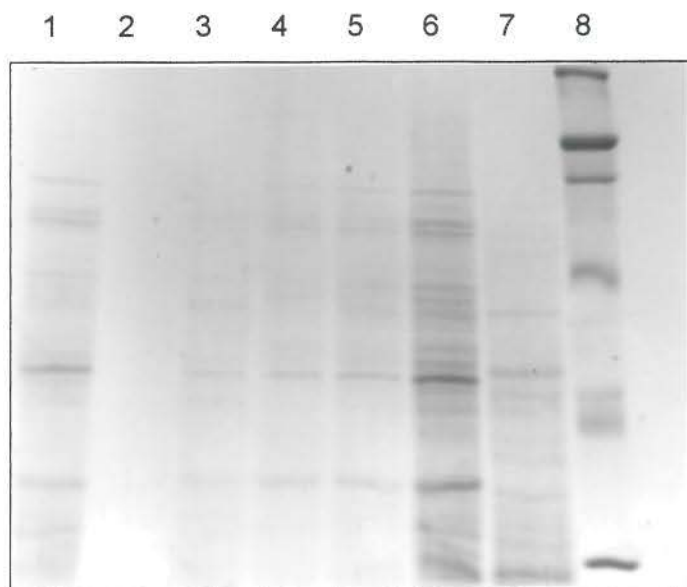


Figura 12. Eletroforese em PAGE-SDS da amostra 4-c de *Candida krusei* submetida a crescimento em 6 (seis) meios de cultura (colunas 1 a 6), amostra de *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), padrão de proteínas BIORAD n° 161.0317 (coluna 8).

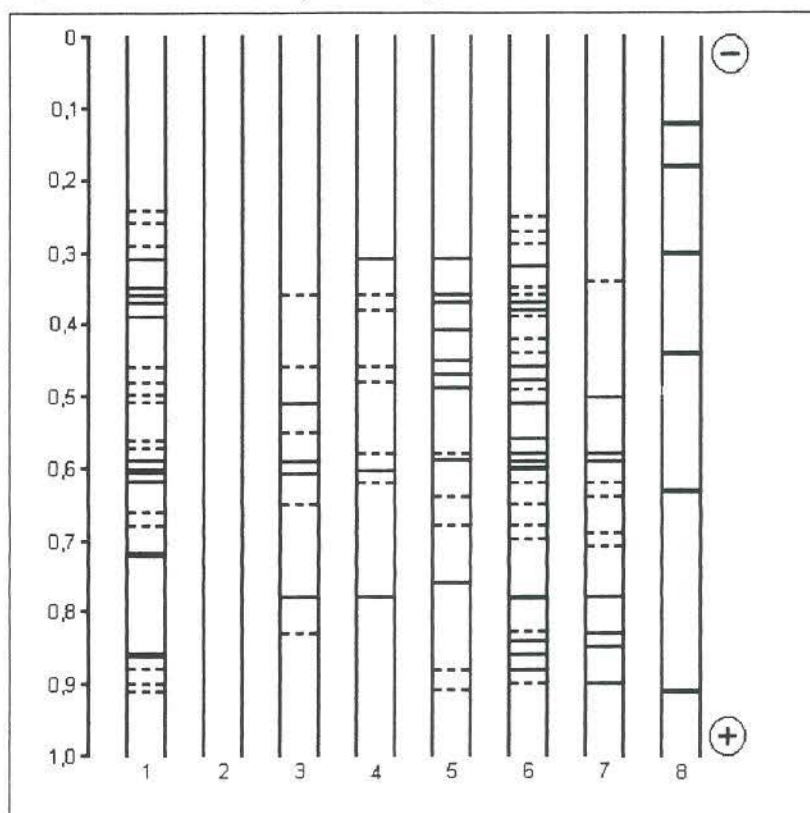


Figura 12.A. Diagrama representativo da eletroforese em PAGE-SDS da amostra 4-c de *C. krusei* (colunas 1 a 6), *Sacharomyces cerevisiae* (coluna 7), Padrão de proteínas BIORAD n° 161.0317 (coluna 8).

4.2. Resultados das densitometrias de integralização da área dos géis de PAGE-SDS e respectivas percentagens comparativas de extração de proteínas de componentes intracelulares das 12 amostras de leveduras submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.

As densitometrias de integralização da área dos géis de PAGE-SDS permitiram a obtenção de percentagens comparativas da extração de proteínas intracelulares das 12 amostras de leveduras do género *Candida* submetidas a crescimento em meios de cultura diversos, as quais podem ser visualizadas na tabela nº 1, a seguir:

Tabela 1. Porcentagens da extração de proteínas obtidas para cada uma das 12 (doze) amostras cultivadas em 6 (seis) meios de cultura.

Meios de Cultura		M.C.L. (1)	B.S.M.A. (2)	A.S.D. (3)	P.L. (4)	A.S.F. (5)	B.C.G. (6)
% de extração proteica das amostras							
C. t r o p i c a l i s	1-b	100	6,89	40,99	61,11	76,43	200,95
	FCF-430	100	48,61	12,11	89,79	30,62	73,18
C. a b i c a n s	F-72	100	11,33	15,46	112,79	48,83	112,41
	E-37	100	15,56	24,17	220,19	109,27	91,72
	97-a	100	37,09	39,88	44,13	22,28	192,81
	17-b	100	6,43	32,46	33,69	29,40	47,47
C. g u i l l e r m o n d i	FCF-152	100	56,44	39,66	180,78	126,52	104,62
	FCF-405	100	18,04	17,62	45,22	59,23	67,3
C. p a r a s o l i s	21-c	100	3,57	10,71	11,60	69,64	103,57
	7-a	100	6,75	5,67	37,78	39,00	51,68
C. k r u s e	IM-90	100	0	10,86	32,58	110,18	112,78
	4-c	100	0	18,82	10,39	38,20	203,93

Esses resultados foram também coligidos e expressos de forma a exibir figuras comparativas das porcentagens de extração de proteínas entre as amostras da mesma espécie de levedura, nos diferentes meios de cultura utilizados, representadas pelas figuras a seguir:

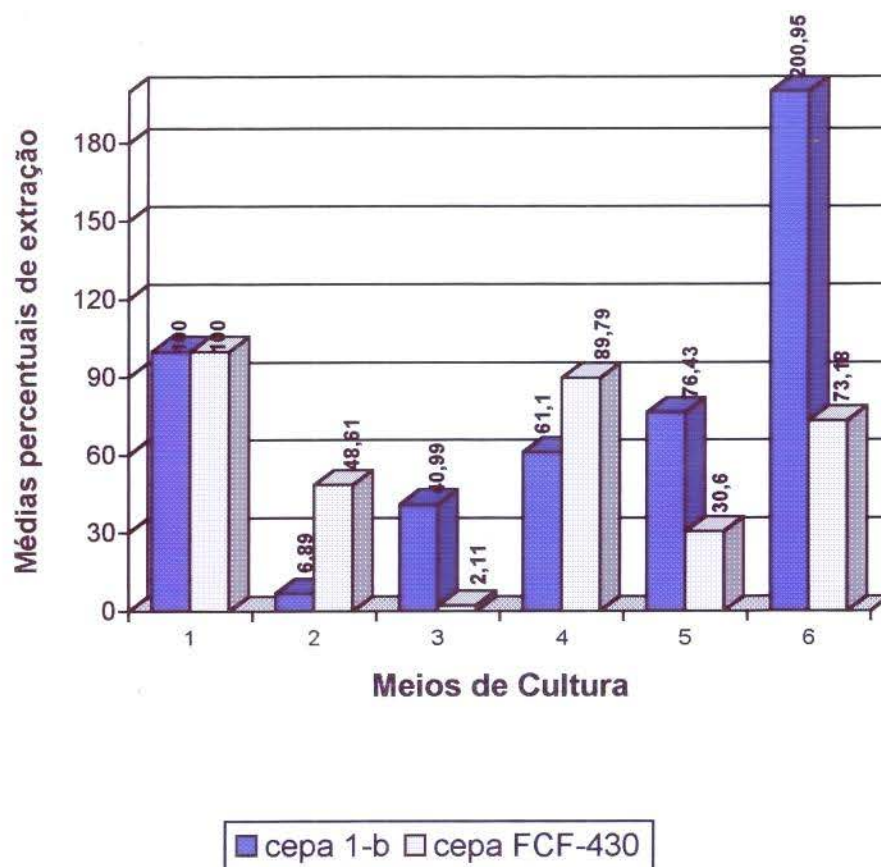


Figura 13. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de *C. tropicalis* submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.

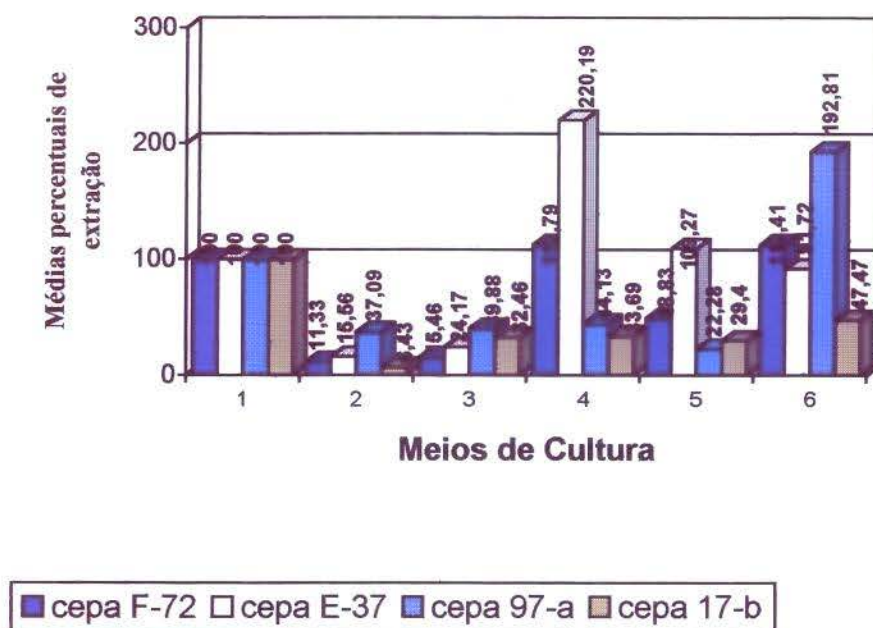


Figura 14. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de *C. albicans* submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.

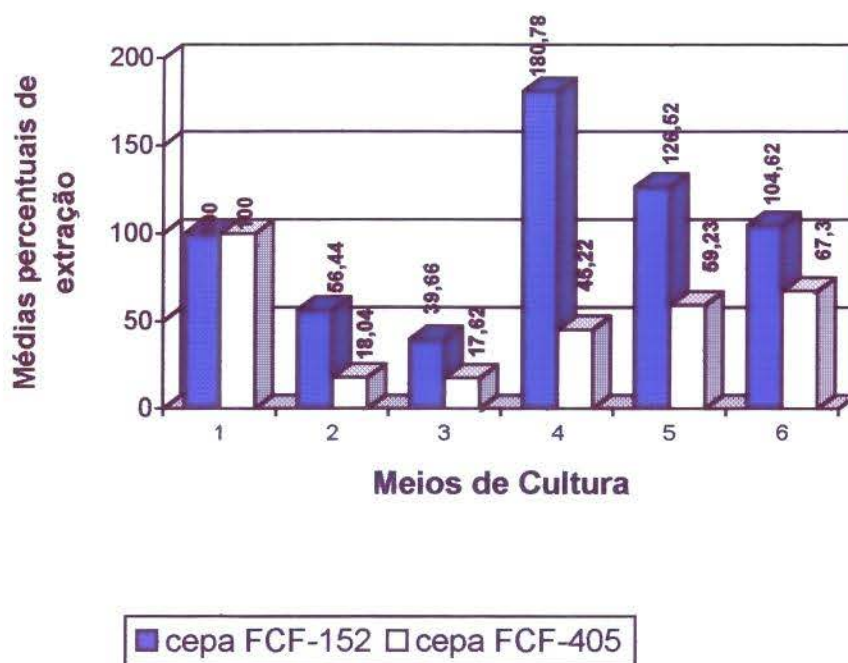


Figura 15. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de *C. guilliermondii* submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.

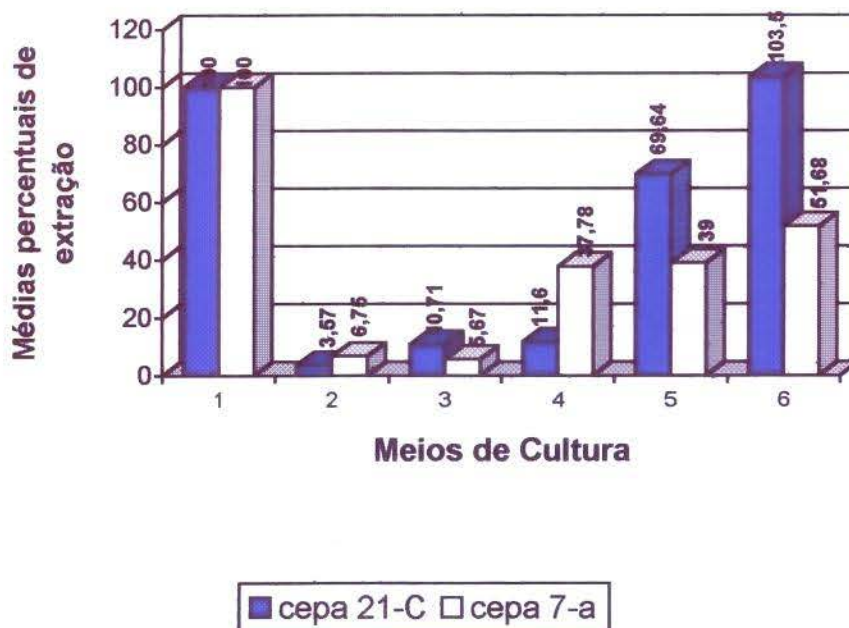


Figura 16. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de *C. parapsilosis* submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.

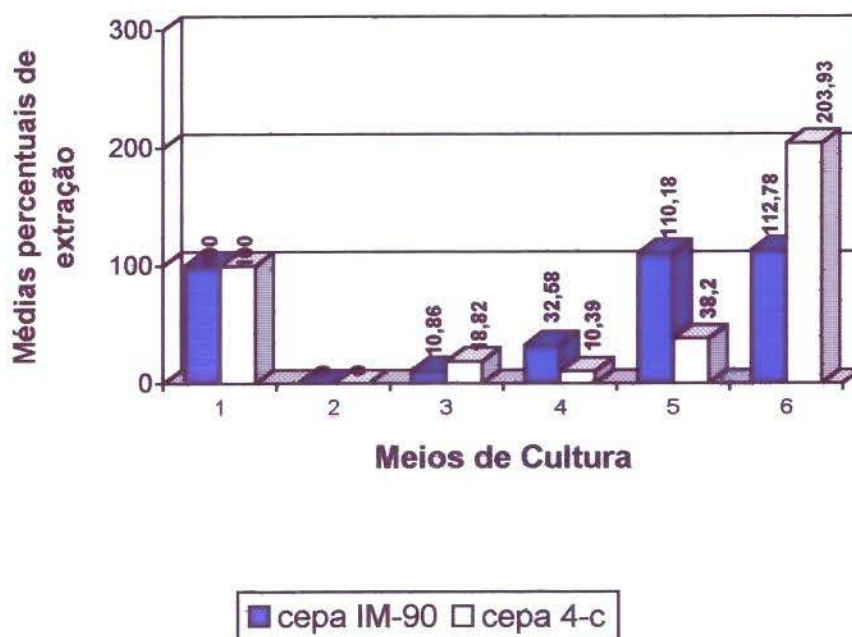


Figura 17. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares de amostras de *C. krusei* submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.

Estão representados a seguir (Figs. 18 a 23) os dados obtidos das porcentagens de extração de proteínas intracelulares das 12 amostras de leveduras para um dado meio de cultura.

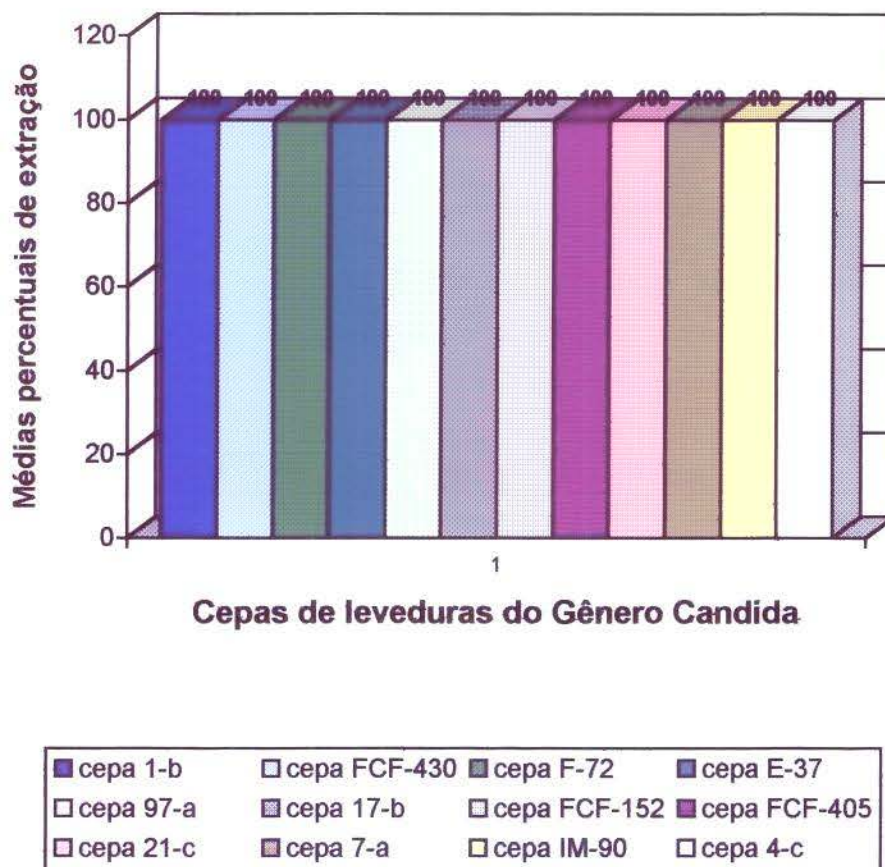


Figura 18. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (M.C.L.).

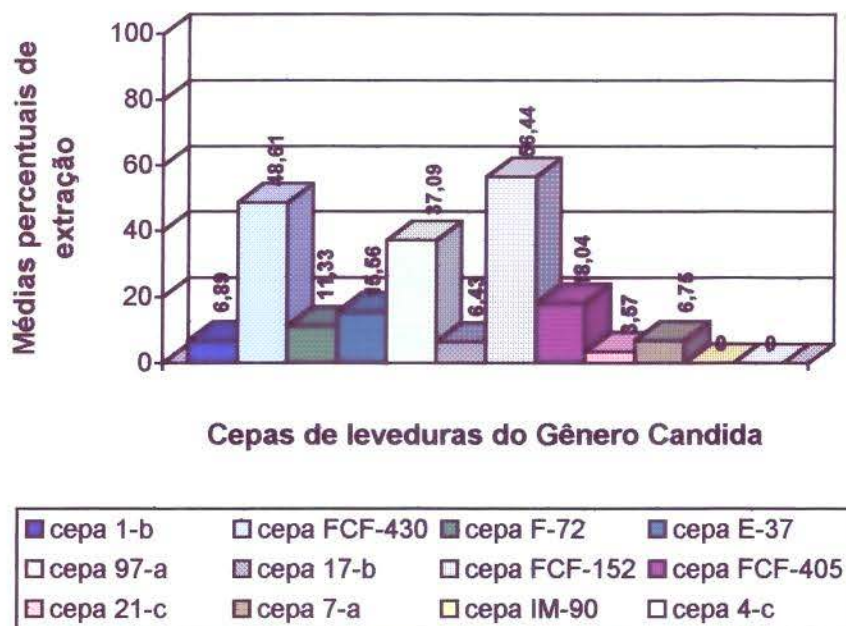


Figura 19. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (B.S.M.A.)

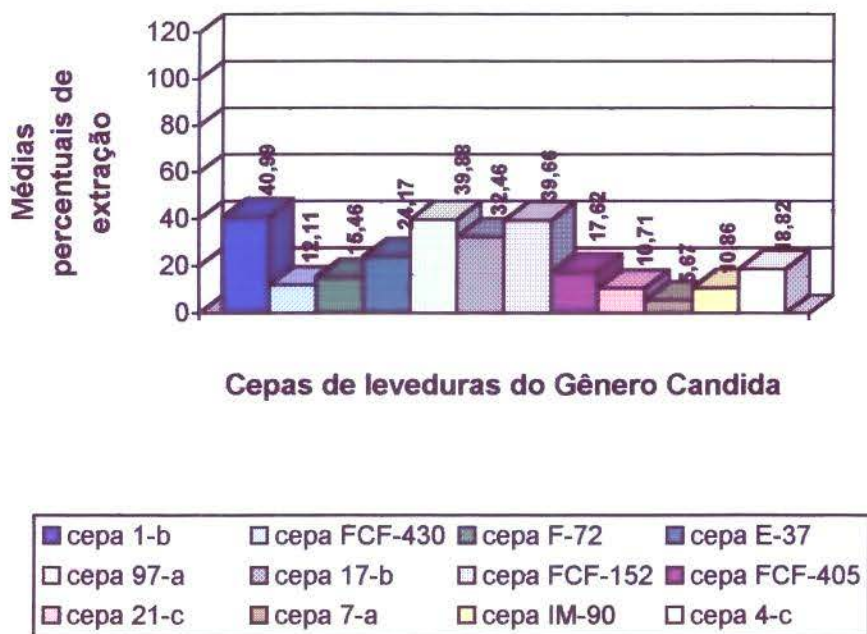


Figura 20. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (A.S.D.)

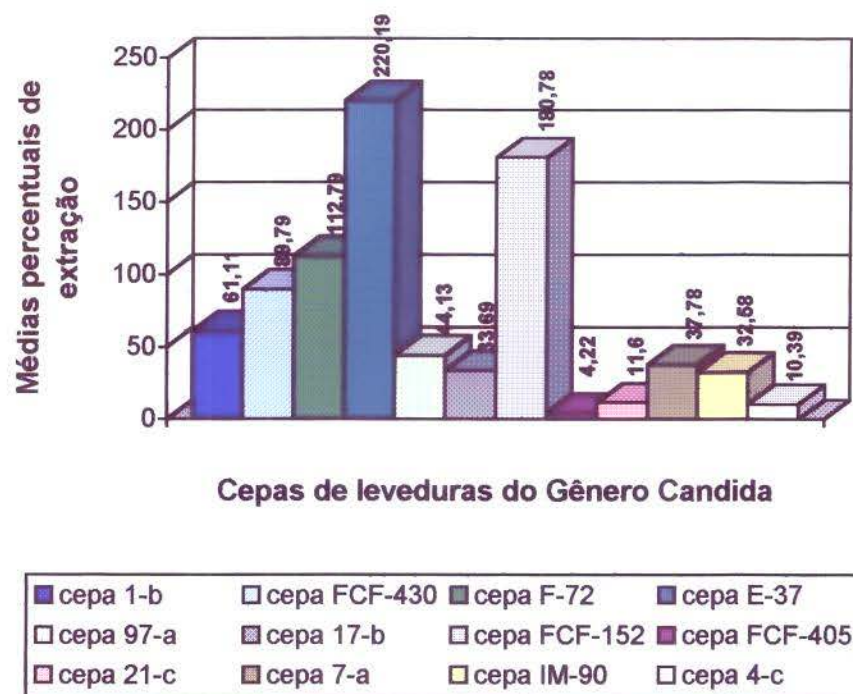


Figura 21. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (P.L.)

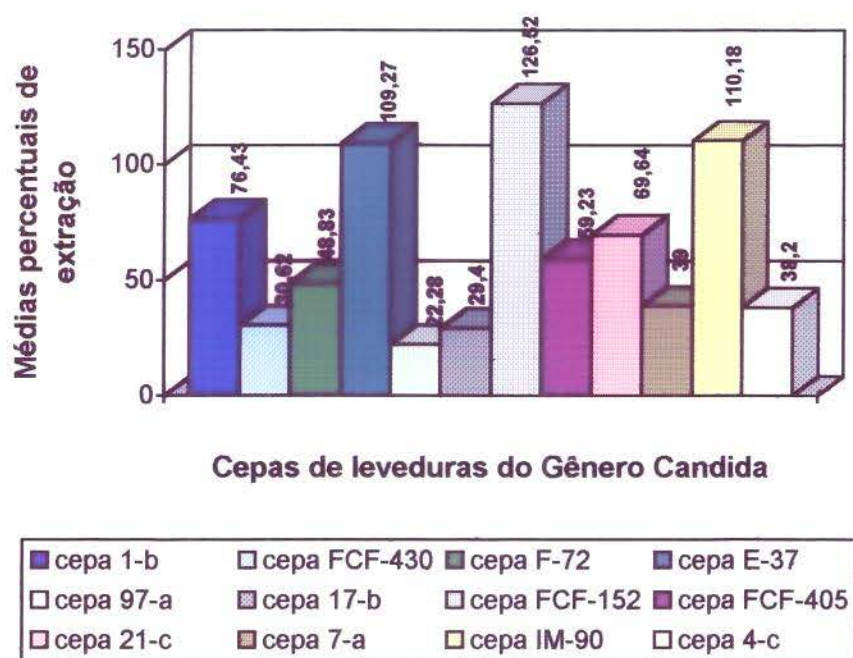


Figura 22. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio (A.S.F.)

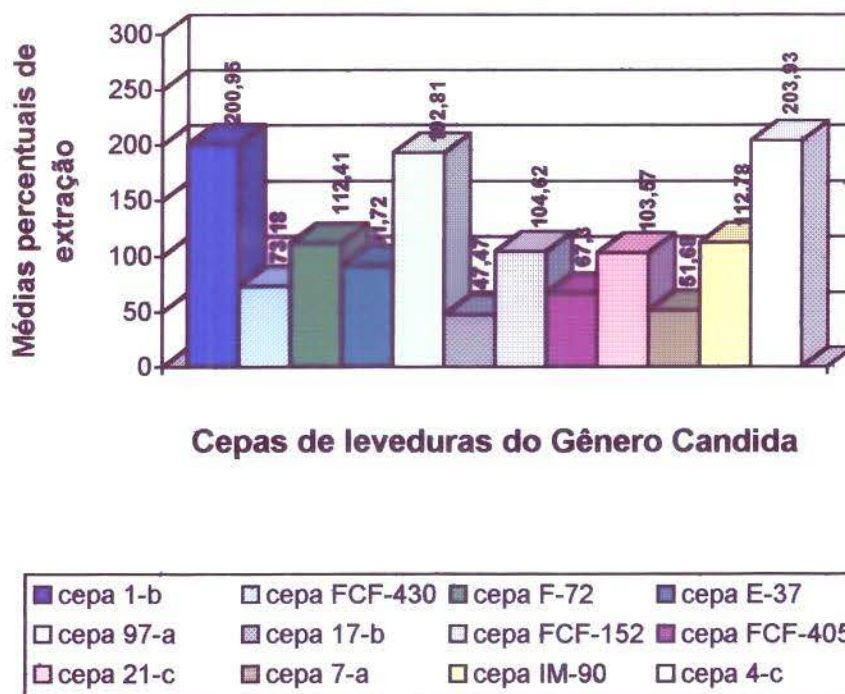


Figura 23. Densitometria de integralização da área dos géis de PAGE-SDS. Porcentagens comparativas da extração de proteínas de componentes intracelulares das amostras de leveduras submetidas a crescimento no Meio *Candida* BCG Agar Base (BCG).

4.3. Dendrogramas comparativos das relações entre as espécies, com base na leitura dos perfis eletroforéticos em PAGE-SDS das proteínas intracelulares de células leveduriformes submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.

As figuras a seguir, numeradas de 24 a 29, mostram os dendrogramas construídos através da análise computacional (software NTSYS) com base nas mobilidades relativas dos perfis eletroforéticos obtidos nas eletroforeses em PAGE-SDS das amostras de leveduras do gênero *Candida* submetidas a crescimento em meios de cultura diversos.

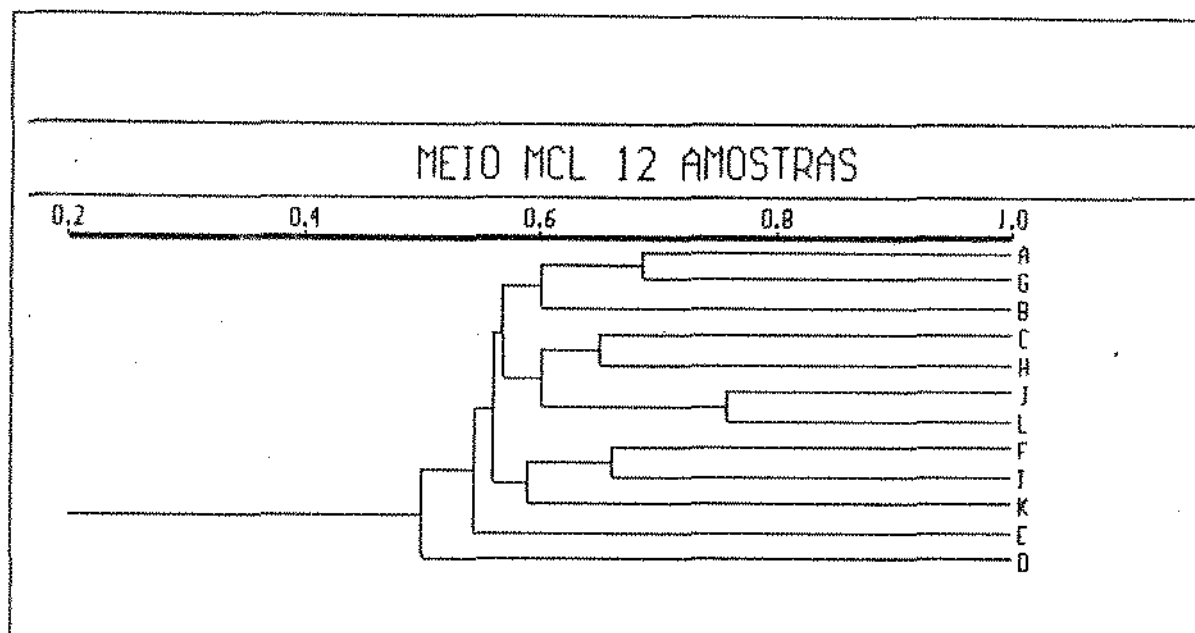


Figura 24. Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero *Candida* obtidas após crescimento no Meio Completo para Leveduras (M.C.L.)

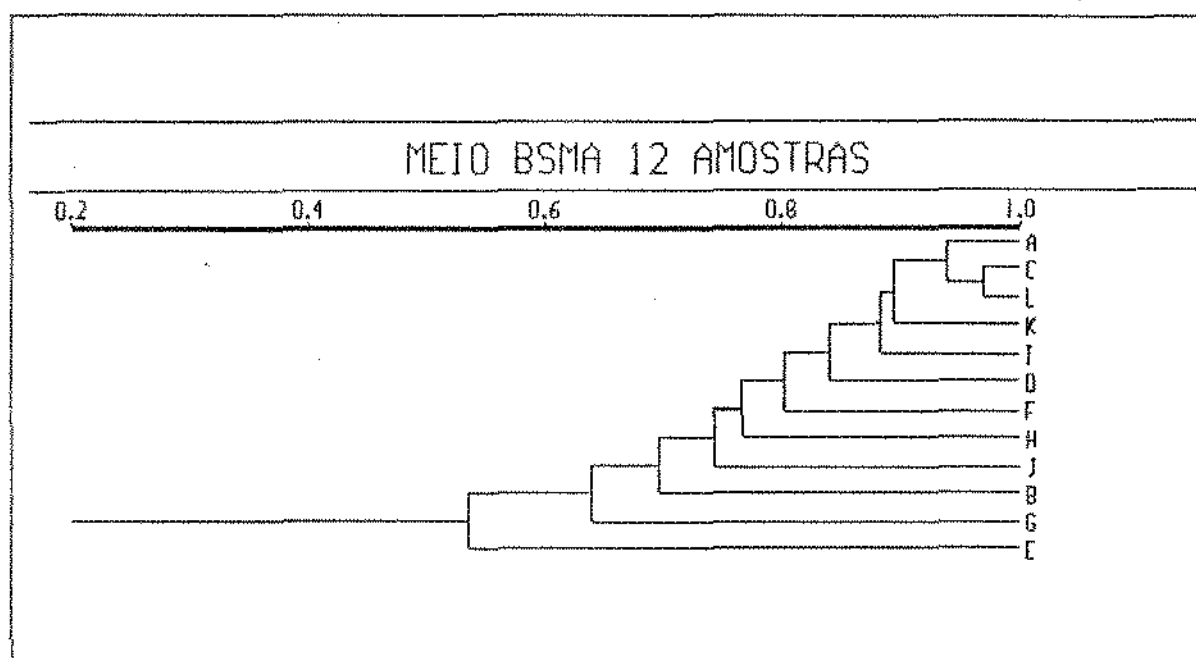


Figura 25. Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero *Candida* obtidas após crescimento no meio de cultura Bacto Sabouraud Maltose Agar (B.S.M.A.)

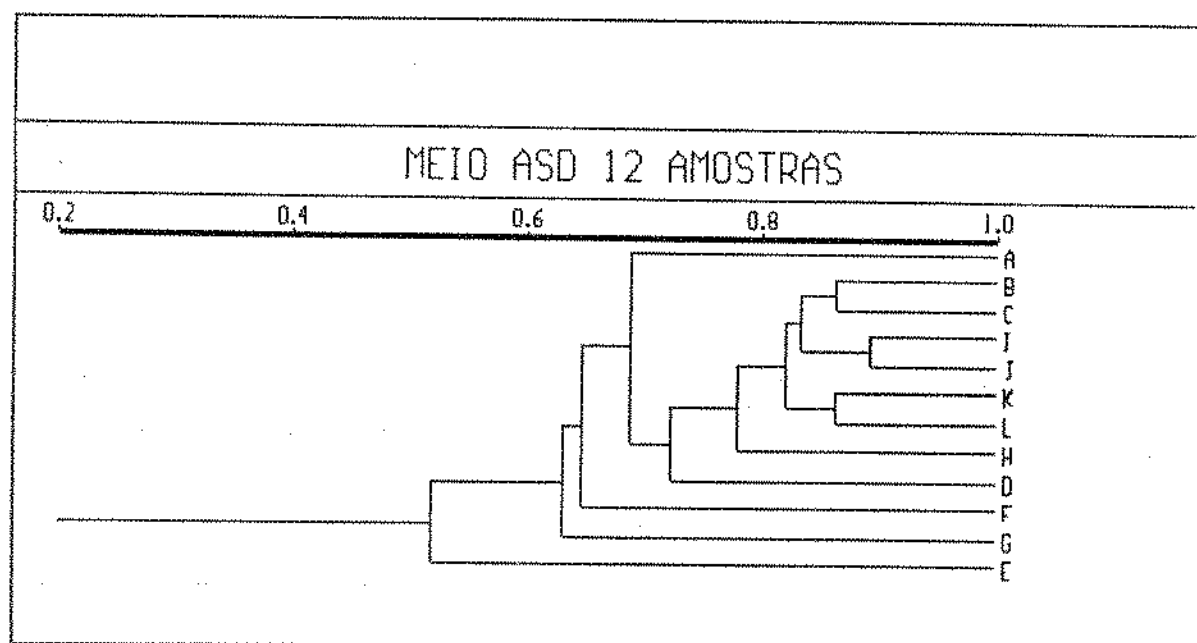


Figura 26. Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero *Candida* obtidas após crescimento no meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (A.S.D.)

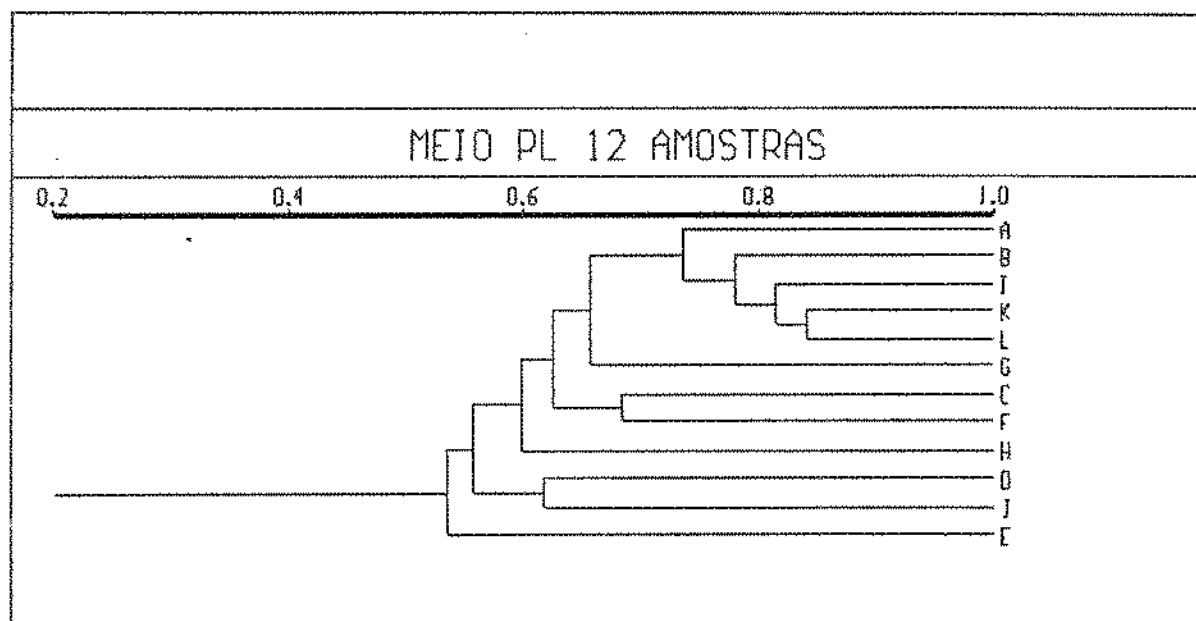


Figura 27. Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero *Candida* obtidas após crescimento no meio de cultura Pagano Levin (P.L.)

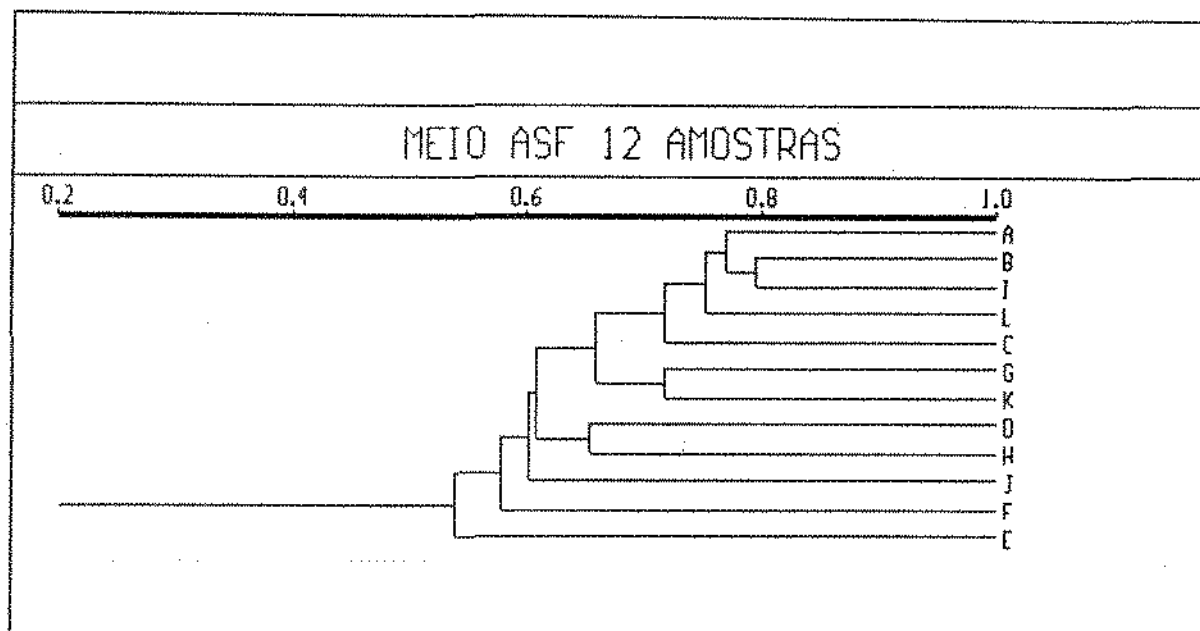


Figura 28. Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero *Candida* obtidas após crescimento no meio de cultura Agar Seletivo para Fungos (A.S.F.)

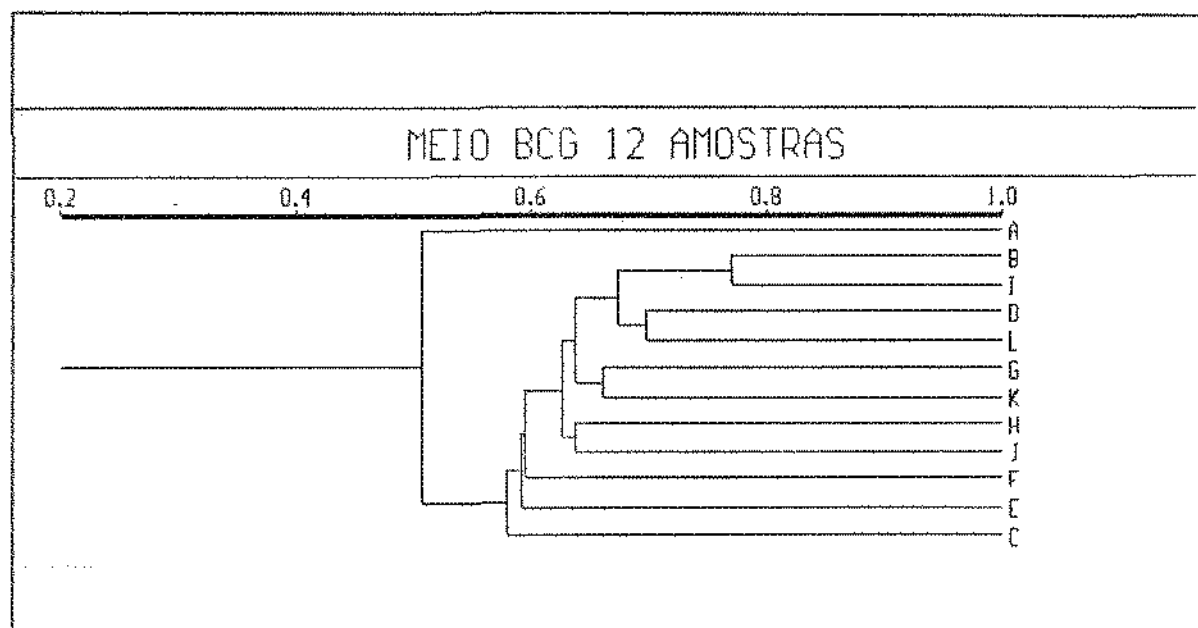


Figura 29. Dendrograma indicativo do percentual de similaridade entre as amostras de leveduras do gênero *Candida* obtidas após crescimento no meio de cultura *Candida* BCG Agar Base (BCG)

5. DISCUSSÃO

As publicações sobre fungos de modo geral, revelam a importância das leveduras nas relações parasita-hospedeiro. Observa-se, por exemplo, no "Medline" de 1990 a 1996, uma média de 800 artigos científicos por ano somente sobre leveduras do gênero *Candida*. Tem-se verificado que as doenças provocadas por esses microorganismos "oportunistas", além de terem a sua incidência aumentada, mostram uma grande diversificação, tanto nos aspectos de relações do hospedeiro com o agente causal, como nos da própria virulência desses microorganismos e seus inúmeros veículos e portas de entrada no organismo. Destaquem-se os trabalhos de CARLOTTI³⁴ *et al.* (1994), SCIACCA²³⁰ *et alii* (1995), NIETO-RODRIGUES¹⁷¹ *et alii* (1996), RAAD²⁰⁵ *et alii* (1996a), RAAD²⁰⁶ *et alii* (1996b) e ROCHELLE²¹⁴ (1996), que reportam o aparecimento dessas micoses em pacientes que receberam transplantes, sondas e cateteres venosos, quando de suas internações hospitalares, além de complicações cirúrgicas diversas.

A cavidade oral pode ser considerada como um reservatório ecológico importante desses organismos, podendo, muitas vezes, disseminarem-se para outras regiões do organismo humano, causando vários distúrbios, principalmente falência renal aguda (NISHIMOTO¹⁷⁴ *et alii*, 1995) e outras lesões orais (MONIACI¹⁵⁷ *et al.*, 1993). Estudos sobre a prevalência e a incidência desses organismos nesse *ecossistema*, têm permitido o aparecimento de inúmeros artigos e relatos científicos, como por exemplo os de BLIGNAUT¹⁹ *et al.* (1991), BLIGNAUT & KOCK¹⁸ (1992), JAAFAR & PETTIT¹⁰⁰ (1993) e SEDGLEY & SAMARANAYAKE²³² (1994), McCULLOUGH¹⁴⁸ *et al.*, (1994) MELONI¹⁴⁹ *et al.* (1995) e MCCARTHY & DAMOGLON¹⁴⁷ (1996).

KOHN¹¹⁵ em 1992, realizou um excelente estudo sobre a sistemática dos fungos e fez uma revisão das metodologias utilizadas com as novas técnicas disponíveis. Saliencia — entre outras coisas — que poucos micologistas têm se dedicado atualmente à sistemática dos fungos. Por outro

lado, o aparecimento de novos protocolos de pesquisa e de diagnóstico, têm contribuído com as pesquisas nessa área de investigação. O Quadro 12, abaixo, mostra os recursos que podem ser usados atualmente, para a pesquisa de novos caracteres na sistemática dos fungos, fazendo com que a sua identificação mais acurada traga — entre outros benefícios — repercussões na clínica e na pesquisa:

Quadro 12. Graus de resolução das técnicas de biologia molecular.

NOVOS CARACTERES	GRAU DE RESOLUÇÃO ESPERADA
Morfológicos	
- histoquímica	espécies, gênero, família
- ultraestrutura	qualquer nível
- conexões anamórficas	gênero, família
- morfologia anamórfica	espécies, gêneros
Genéticos	
- habilidade de acasalamento e de formar F1	espécie
- incompatibilidade vegetativa	intraespecífica
- inter-esterilidade micelial	espécies
Biológicos	
- hospedeiro ou substrato	intraespecífico, espécies e gênero
- biogeografia	qualquer nível
Moleculares	
- proteínas: - imunologia	qualquer nível
- sequenciamento	qualquer nível
- eletroforese de isozimas	população, intraespecífico e espécies
	intraespecífico, espécies e qualquer nível
- DNA: - análises de restrição	qualquer nível
- mapas de restrição	qualquer nível
- PCR	qualquer nível
- extensão dos polimorfismos	qualquer nível
- análise de restrição	intraespecífico (genético)
- sequenciamento direto	
- RAPD	

Como ferramenta importante nesses estudos, que envolvem a Biologia Molecular, a eletroforese tem desempenhado um importante papel como complementação na investigação dos processos patológicos do organismo, definindo perfis de deficiências genéticas e adquiridas, além de permitir avanços na identificação e classificação taxonômica dos diversos agentes patogênicos (HELENA LABS. BOOKLET nº 01 M, 1994; MEYER¹⁵³ *et al.*, 1993; KAN¹¹³, 1993; JORDAN¹⁰⁷, 1994; KURTZMAN¹¹⁸, 1994; MAIWALD¹⁴³

et al., 1994; MONTILLA¹⁶⁰ *et al.*, 1995; NODA & KAWAHARA¹⁷⁵, 1995; KORSTANJE¹¹⁷, 1995; TROUNGOS²⁷⁰ *et al.*, 1995; LIN¹²⁸ *et al.*, 1996; MAENZA¹³⁶ *et al.*, 1996).

Objetivando-se contribuir para os estudos de identificação e caracterização desses organismos, com ênfase particular na taxonomia e sistemática, estudou-se a *influência* de alguns meios de cultura no cultivo e extração de proteínas intracelulares das células leveduriformes para aplicação em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).

Os dados obtidos em nossas investigações, permitiram primeiramente, constatar que os meios de cultura utilizados como suporte para o desenvolvimento das células leveduriformes, **interferem** posteriormente na extração de proteínas de componentes intracelulares desses microorganismos. Como se pode verificar nas figuras 1 a 12, 1A a 12A e sobretudo na tabela 1, as diferentes amostras de espécies de leveduras submetidas a crescimento nos diversos meios de cultura, exibiram um perfil eletroforético diversificado e característico para os diferentes meios usados, demonstrando graus variados de porcentagens de extração de proteínas (tabela 1) para um dado meio de cultura — em particular — e também em relação aos outros meios, quando comparados. SHECHTER²³⁵ (1973) demonstrou que meios de cultura com composições químicas diferentes, podiam provocar o desenvolvimento de leveduras até mesmo com morfologias variadas, sendo também verificadas por NICKERSON¹⁶⁹ (1963), alterações morfológicas ultraestruturais em leveduras submetidas a crescimento em meios de cultura com composição diversa, sobretudo naqueles que apresentavam maltose.

Tais resultados, em conjunto, **sugerem** a necessidade de se conhecer melhor e especificamente o tipo de meio de cultura mais apropriado para estudos da natureza em questão, no sentido de adequá-los aos propósitos dessa linha de investigação. Dentro ainda dessa linha de raciocínio, muitos investigadores como RUSTCHENKO-BULGAC²²⁰ (1991), em seus diferentes protocolos de pesquisa, reportaram o uso de meios de cultura que variam deste para aquele trabalho, sem se darem conta que diferenças na

qualidade e na quantidade de seus componentes possam influir metodologicamente. Alguns meios de cultura possuem maltose na sua composição, que é utilizado como fonte de energia para o metabolismo fúngico (BSMA) enquanto que outros, utilizam a glucose (M.C.L., A.S.D., P.L., BCG, ASF). Também a presença de fatores estimulantes do crescimento leveduriforme (extrato de leveduras, vitaminas), presentes nos meios BCG, P.L. e M.C.L., estão em contraste com aqueles meios que não os possuem, como o A.S.D. e o B.S.M.A. Além disso, a concentração desses componentes pode variar de um meio para o outro (vide a formulação dos meios no anexo 1), fazendo com que os organismos possam utilizá-los de maneira diversa.

Os dados provenientes das densitometrias de integralização da área com base nos géis de PAGE-SDS (figuras 13 a 23), mostraram **diferenças qualitativas e quantitativas**, quando foram analisados. Esses resultados reforçam aqueles relatados anteriormente em relação aos perfis eletroforéticos das proteínas intracelulares (figuras 1 a 12) e respectivos diagramas representativos (figuras 1A a 12A), somados aos diferentes percentuais de extração protéica obtidos dessas amostras (tabela 1). Esses resultados revelaram uma **grande variabilidade** entre as várias espécies estudadas, tendo como base a leitura dos diversos perfis eletroforéticos exibidos por esses organismos, **sugerindo** que o cultivo dessas células leveduriformes leva a uma expressão genética diversa nesses meios de cultura. Observações semelhantes foram feitas por outros pesquisadores nessa linha de investigação (HALL⁸⁴, 1965; SOLTIS²⁴⁶ *et alii.* (1983); BRUNEAU & GUINET²⁸, 1989; PITTET¹⁹⁸ *et al.*, 1991; BIDENNE¹⁵ *et al.*, 1992; PFALLER¹⁹⁵, 1992; PFALLER & WENZEL¹⁹⁶, 1992; ADRIO¹ *et al.*, 1995; PIRES¹⁹⁷ *et al.*, 1996), os quais demonstram, de modo geral, que houve **intensa variação das expressões das bandas nas eletroforeses**, dependendo do meio de cultivo utilizado. Os trabalhos de alguns pesquisadores, como ROMANO²¹⁷ *et al.* (1994); LIU¹²⁹ *et alii.* (1995), ROBERT²¹³ *et al.*, 1995; JANBON¹⁰² *et alii.* (1995), mesmo que levados a efeito com outras estruturas celulares — os quais reportam a análise do cariótipo de espécies de leveduras do gênero *Candida*

com base genotípica para a sua classificação e identificação — foram feitos com o mesmo meio de cultura, o que permite uma comparação somente como base no meio escolhido. É possível que pesquisas semelhantes, utilizando-se de outros suportes de crescimento, levem a diversificadas interpretações do ponto de vista do relacionamento entre as espécies.

As análises filogenéticas dos seres vivos, têm contribuído muito para um melhor entendimento de suas relações de afinidade e questões taxonômicas evolutivas. Vários autores têm reportado pesquisas sobre o assunto direta ou indiretamente, destacando-se os trabalhos de Höfling e colabs., (trabalho em vias de publicação), com espécies de leveduras da cavidade bucal e outros, como os de ROSA²¹⁸ *et alii.* (1996), na análise de proteínas intracelulares, que contribui para a taxonomia de diversos microorganismos. MAHROUS¹⁴² *et alii.* (1992), VASQUEZ²⁷⁷ *et al.* (1993), NISENGARD & NEWMAN¹⁷³ (1995), SULLIVAN²⁵⁴ *et al.* (1995) salientaram que as relações entre as cepas de diversos microorganismos, incluindo fungos e leveduras, podem ser analisadas com base nos seus respectivos dendrogramas. Esses dendrogramas se tornam um “mapa taxonômico”, principalmente quando puderem incluir cepas padrões de referência, para que se possa fazer o correlacionamento com as cepas estudadas. A partir daí, pode-se sugerir ainda, a realização de métodos de taxonomia numérica, que envolvam a análise de 100 a 200 caracteres diferentes desses microorganismos. Trabalhos como os de WILLINGER²⁸⁸ *et al.* (1994a) e WILLINGER²⁸⁹ *et al.* (1994b) além dos de SWEET²⁵⁷ *et al.*, (1995), com o uso da biologia molecular, têm conseguido determinar o aparecimento de novas espécies de leveduras (*Candida dubliniensis* sp. nov.), através dos novos caracteres moleculares e da análise de seus dendrogramas de afinidade.

A análise dos dendrogramas (figuras 24 a 29), obtidos a partir das leituras dos perfis eletroforéticos das espécies, revela que as 12 amostras de leveduras do gênero *Candida*, independentemente do tipo de meio de cultura utilizado para o seu desenvolvimento, apresentaram sempre porcentagens de similaridade acima de 50%. No entanto, entre as diversas

amostras pode-se constatar (dependendo do tipo de meio de cultura), diferenças significativas, mesmo entre aquelas da mesma espécie, sugerindo uma **possível influência** dos diferentes componentes constitutivos dos meios de cultura na expressão protéica dessas leveduras. Esses dendrogramas, indicativos do grau de porcentagem de similaridade para dados de proteínas intracelulares entre as espécies analisadas, demonstraram, portanto, uma **grande variabilidade** quando comparados, levando a **diversificadas interpretações** do ponto de vista do relacionamento entre as mesmas.

Os dados obtidos e expressos pelo perfil eletroforético, densitometria da área dos géis e dendrogramas comparativos entre as espécies de leveduras, indicam a **necessidade de padronização e escolha de uma metodologia mais adequada** e capaz de obter o **máximo de proteínas dos componentes intracelulares**, para aplicação em eletroforese, com ênfase nos estudos de identificação e caracterização desses microorganismos.

BRONDZ & OLSEN²³ (1993) e O'DONNELL¹⁷⁷ *et al.*, (1994), estudando os aspectos teóricos e práticos da quantificação da biodiversidade entre os diversos grupos de microorganismos, formularam novos conceitos para o estudo das bactérias e dos fungos, organismos que geralmente apresentam inúmeros problemas taxonômicos. Salientam que os procedimentos moleculares também não conseguem solucionar todas as dúvidas encontradas com esses microorganismos, devendo somente o avanço das pesquisas apontar as várias falhas e as eventuais soluções, o que também pode ser compartilhado por XU & SAMARANAYAKE²⁹¹ (1994), BETREMIEUX¹⁴ *et al.*, (1995) e BRANCHINI²² *et al.*, (1996).

Os resultados obtidos e relatados nessa Tese, associados às observações recentes levadas a efeito nos laboratórios de Microbiologia da FOP-UNICAMP com leveduras da cavidade bucal, (trabalho em vias de publicação) os quais mostraram que **metodologias diferentes de extração de componentes intracelulares** para aplicação em PAGE-SDS, levam a diferentes leituras dos perfis eletroforéticos — quando várias espécies são

comparadas — permitem que esses dados (em conjunto), abram espaço para outras investigações de natureza similar, elucidando e complementando as diversas pesquisas que têm sido feitas nessa linha de investigação.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1) A composição e as características dos diferentes meios de cultura utilizados como suporte para o desenvolvimento de leveduras do gênero *Candida* obtidas da cavidade oral, **interferem** na extração de proteínas de componentes intracelulares desses microorganismos.
- 2) O Meio Completo para Leveduras (M.C.L.) mostrou ser aquele que permitiu o melhor desenvolvimento para todas as amostras de leveduras pesquisadas.
- 3) O perfil eletroforético exibido por essas espécies, são **diversificados qualitativa e quantitativamente**, quando comparados.
- 4) A concentração de proteínas resultantes da extração de componentes intracelulares das células leveduriformes analisadas, visualizadas pelo perfil eletroforético e reforçados pelas respectivas densitometrias de integralização da área dos géis em PAGE-SDS, **são diferentes quantitativamente**, para os diversos meios de cultura utilizados.
- 5) Os dendrogramas obtidos, indicativos do grau de porcentagem de similaridade para dados de proteínas intracelulares entre as espécies analisadas, apresentam **grande variabilidade** quando comparados, levando a **diversificadas interpretações** do ponto de vista do relacionamento entre as mesmas.
- 6) De modo geral, os dados obtidos e expressos pelo perfil eletroforético, densitometria da área dos géis e dendrogramas comparativos entre as espécies de leveduras, apontam para a necessidade de **padronização e escolha de uma metodologia mais adequada e capaz de extrair o**

máximo de proteínas de componentes intracelulares, para aplicação em estudos de identificação e caracterização desses microorganismos.

- 7) A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS), provou ser uma técnica de valor complementar e um recurso importante em estudos de afinidade filogenética entre as espécies de leveduras estudadas.

ANEXO I

Meios de Cultura utilizados:

1. Meio Completo para Leveduras (M.C.L.)

neopeptona	5g
extrato de levedura	5g
fosfato dibásico de potássio	0,25g
glicose	10g
agar	10g
H ₂ O dest. q.s.p.	500 ml
autoclavar por 15' a 121°C	

2. Bacto Sabouraud Maltose Agar (B.S.M.A.)

neopeptona	5g
maltose	20g
agar	7,5g
H ₂ O dest. q.s.p.	500 ml
autoclavar por 15' a 121°C	
pH final = 5,6 +/- 0,2 a 25°C	

3. Agar Sabouraud Dextrose (A.S.D.)

peptona	5g
dextrose	20g
agar	10g
H ₂ O dest. q.s.p.	500 ml
autoclavar por 15' a 121°C	

4. Bacto Pagano-Levin Agar (P.L.)

bacto peptona	5g
bacto extrato de levedura	0,5g
bacto dextrose	20g
bacto agar	7,5g
H ₂ O dest. q.s.p.	500 ml

autoclavar por 15' a 121°C

adicionar 50 µg de 2, 3, 5 *triphenyltetrazolium chloride* quando a temperatura do meio atingir de 50 a 55°C.

acrescentar 500 µg de neomicina/ml do meio

5. Agar Seletivo para Fungos (A.S.F.) — BIOBRÁS

peptona de soja	10g
dextrose	10g
ágar	15,5g
cicloreximida	0,4g
cloranfenicol	0,05g
H ₂ O dest.	1.000 ml

autoclavar 15' a 121° C

pH final = 6,9 a 25° C

6. Candida BCG Agar Base

peptona	10g
extrato de levedura	1g
dextrose	40g
agar	15g
verde de bromocresol	0,02g
H ₂ O dest. q.s.p.	1.000 ml

autoclavar por 15' a 121°C

pH final = 6,1 +/- 0,1 a 25°C

acrescentar 500 µg de neomicina/ml do meio

ANEXO II

Soluções utilizadas:

1. Para extração dos componentes celulares:

- **mistura dissociante de BRUNEAU & GUINET, 1989**

- tris 5 mM;
 - EDTA 5mM;
 - β -mercaptoetanol 2,5%;
 - SDS 1,5%;
 - glicerol 10%;
 - azul de bromofenol 0,025%;
 - H₂O q.s.p. 50 ml
- nitrogênio líquido a -196° C
 - solução salina estéril gelada

2. Para a eletroforese:

- Solução 1:

- HC1 1 N 48 ml
 - Tris 36,6g
 - Temed 0,23 ml
 - H₂O q.s.p. 100 ml
- pH final = 8,9

- Solução 2:

- HC1 1 N 48 ml
 - Tris 5,98g
 - Temed 0,46 ml
 - H₂O q.s.p. 100 ml
- pH final = 6,7

- Solução 3:

- acrilamida	50g
- bis-acrilamida	0,5g
- H ₂ O q.s.p.	100 ml

- Solução 4:

- acrilamida	16g
- bis-acrilamida	1,5g
- H ₂ O q.s.p.	100 ml

- Solução 5:

- persulfato de amônia	10g
- H ₂ O	100 ml

- Solução tampão de corrida:

- tris	6g
- glicina	28,8g
- H ₂ O q.s.p.	1000 ml
- acrescentar SDS a 0,1%	
- Para uso diluir 1/10.	

- Solução corante:

- <i>Coomassie blue</i> G 250	0,2g
- metanol	40 ml
- ácido acético	10 ml
- H ₂ O q.s.p.	100 ml

- Solução para descoloração e estoque do gel:

- metanol	10 ml
- ácido acético	5 ml
- H ₂ O q.s.p.	100 ml

- Solução para lavagem dos materiais da eletroforese:

- detergente Triton 0,1 ml
- H₂O dest. 300 ml

- Solução desidratante:

— A:

- metanol 65 ml
- H₂O dest. 35 ml

— B:

- glicerol 0,5 ml
- H₂O dest. 99,5 ml

— Para uso misturar a solução A com a B em partes iguais.

- Solução de agar vedante:

- bacto agar 2g
- H₂O q.s.p. 100 ml

ANEXO III

Aparelhos, equipamentos e materiais utilizados:

- autoclave vertical Luferco - Lutz Ferrando tipo Phoenix modelo AV-50;
- estufas de sacagem e esterilização marca Fanem modelo 315 SE;
- tubos de ensaio de vidro de 13 x 100 mm;
- placas de Petri de 20 x 100mm;
- balões volumétricos de 100, 250, 500 ml;
- frascos Erlenmeyer de 250, 500 e 1000 ml;
- frascos Becker de 100, 250, 500 e 1000 ml;
- provetas graduadas de 100, 250, 500 e 1000 ml;
- pipetas de Pasteur;
- pipetas sorológicas de 1, 2, 5 e 10 ml;
- algodão hidrófilo;
- destilador de água marca Tecnal;
- fogareiro a gás de duas bocas;
- agitador de tubos marca Phoenix modelo AT-56;
- painéis de alumínio;
- pente de acrílico de 10 e 12 dentes para fazer canaletas no gel;
- cuba de eletroforese de acrílico de 15,5 x 17,5 cm;
- graxa de silicone marca implastec Plásticos Técnicos Ltda.;
- tira de borracha;
- prendedores de pasta de escritório;
- placas de vidro recortadas de 14,5 x 16,5 cm;
- fonte de eletroforese marca Minipa MS-65 da Auje Ind. Eletrônica;
- fios e cabos conectores da fonte de eletroforese para a cuba de acrílico;
- cubas plásticas com tampa para colocação dos géis da eletroforese que vão corar, fixar, descorar e desidratar;
- ponteiros plásticos descartáveis de 1,5 e 10 ml, marca Cacil;

- régua plástica graduada de 30 cm;
- tubos tipo Ependorf de 1 ml;
- câmara de Neubauer;
- *graa/* de porcelana de 200 ml;
- Shaker da Nova Técnica Instrumentos e Equipamentos Ltda.;
- Centrífuga Fanem modelo 215 da Fanem Indústria e Comércio;
- Centrífuga Centrim, modelo 242, da Fanem Indústria e Comércio;
- Fonte para eletroforese da Técnica Permatron Indústria e Comércio Ltda.;

SUMMARY

Fungi, especially the genus *Candida* yeasts, are potentially pathogenic agents, able to cause numberless illnesses in being, particularly when take advantage in the fall of the organic resistance, being considered opportunists. The arise of the Acquired Immune Deficiency Syndrome, seems suitable, that the increasing amplification of researches with these microorganisms, which has been studied in physiological, biochemical, serological, genetical, etc., point of view. In the oral cavity, are responsible for illnesses that affect various orals structures, justifying the increase of clinical cases and the investigations in this area.

Among the techniques that have been used with the objective to identify and characterize these organisms from the Molecular Biology attends, a powerful investigator role. The SDS-PAGE, has been shown a technique of complementary value and important studies of identification and characterization of these microorganisms. Although, the vast diversity of methodologies that are used to obtain the intracellular protein components of these organisms, besides other factors, like cultivate media, temperature conditions, pH, etc. — that influence its development — suggest the necessity to standardize and choose the most adequate for the sample to be studied.

The present study had the basic objective to study the influence of some cultivate media used for the development of yeast cells, objectifying the obtainment of the intracellular protein components for the application of electrophoresis, emphasizing in the study of the electrophoretic profile of these microorganisms.

Yeast's samples, of different *Candida*'s species, collected from the oral cavity, were submitted to the growth in six various cultivate media. After the cellular development, the break soluble protein, obtained by the extraction with the liquid nitrogen and with the use of the dissociation mixture of Bruneau

& Guinet (1989), was submitted to SDS-PAGE. The electrophoresis standards obtained, provided diagrams and were treated computationally, which generated graphs of the respective integration densimetries in the areas of gels with the percentages of the proteins extraction for each sample of the cultivate media, besides the respective dendrograms comparatives, that permit analysis with the relations of similarity between the samples, in a preliminary study.

The results shows that the composition and the characteristics of the cultivate media used like support for the cellular development, **interfere** in the extract of the intracellular protein components of these microorganisms. The electrophoretic profile exhibited by the species are **diversify quality and quantifying** when compared. The concentration of proteins obtained from the extraction of the intracellular yeast's components , visualized by the electrophoretic profile and reinforced by respective densimetries of the integralization in the area of gels of SDS-PAGE, are **qualifying different**s, for the cultivate media used. The dendrograms indicates the degree of percentage of similarity between the analyzed species, show **vast variability**, getting the **varies interpretation** by the view of the relationship between the same. The data obtained and expressed in this research, point to the **necessity of standardize and choose more than one adequate methodology and able to extract the maximum of intracellular protein components of these microorganisms**. The SDS-PAGE, proved to be a technique of complementary value and important in studies of phyllogenetic affinity between the species of the studied yeasts.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADRIO, J. L. et al. Electrophoretic karyotype of the astaxanthin — producing yeast *Phaffia rhodozyma*. **Curr. Genet.** 27 (5):447-450, 1995.
2. AHEARN, D. G. Medically important yeasts. **Ann. Rev. Microbiol.** 32: 59-68, 1978.
3. ALFENAS, A. C. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. **Can. J. Bot.** 62(8): 1756-1762, 1984.
4. ———. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991.
5. ALLEN, C. M. Oral candidiasis. **Dental Abstracts** 37(3): 100, 1992.
6. ALMEIDA, J. R. Curso sobre fermentação alcoólica. Vol. 1, Piracicaba: Instituto Zimotécnico da Universidade de São Paulo, 1960.
7. ALMEIDA, M. E. S. et al. Identificação da microbiota fúngica de ambientes considerados assépticos. **Rev. Saúde Públ.** 22(3): 201-206, 1988.
8. AMES, G. F. L. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. **J. Biol. Chem.** 249(2):634-644, 1974.
9. AXELSEN, N.H. Quantitative immunoelectrophoretic methods as tools for a polyvalent approach to standardization in the immunochemistry of *Candida albicans*. **Infect. Immun.** 7(6): 949-960, 1973.
10. BARNS, S.M. et al. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. **J. Bact.** 173(7):2250-2255, 1991.
11. BARTELS, H. A., BLECHAMN, H. Survey of the yeast population in saliva and an evaluation of some procedures for identification of *Candida albicans*. **J. Dent. Res.** 6:1386-1390, nov./dec., 1962.
12. BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Ann. Rev. Microb.** 22:87-108, 1968.
13. BERTOLINI, P. **Contribuição ao estudo taxonômico de leveduras isoladas de canais radiculares de dentes humanos**. Tese

(Doutoramento em Biologia e Patologia Buco-Dental - Microbiologia e Imunologia) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1964.

14. BETREMIEUX, P. *et al.* Use of DNA fingerprinting and biotyping methods to study a *Candida albicans* outbreak in a neonatal intensive care unit. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 13(10): 899-905, 1994.
15. BIDENNE, C. *et al.* Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.** 22(1):1-7, 1992.
16. BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEU, S. Étude électrophorétique et immunologique comparée des antigènes de quelques levures du genre *Candida* (*C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. macedoniensis*). **Mycopathologia** 17: 239-254, 1962b.
17. BITTENCOURT, M. J., LACAZ, M. L. Electrophoretic study of the genome of porcine rotaviruses from São Paulo, Brasil. **Rev. Microbiol.** 23(2):86-90, 1992.
18. BLIGNAUT, E., KOCH, J.L.F. The presence of yeasts on carious and non-carious teeth. **J.Dent.Res.** 71(4): 961, 1992.
19. _____, SENEKAL, R., KOCH, J.L.F. Differences in the oral yeast flora of a rural and urban population. **J.Dent.Res.** 70(Special Issue): 659, 1991.
20. BÖHLER, K. *et al.* Immunohistochemical study of in vivo and in vitro Ig A coating of *Candida* species in vulvo vaginal candidiasis. **Genitourin. Med.** 70(3): 182-186, 1994.
21. BOOTH, T. Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems. **Rev. Microbiol.** 10(4): 123-138, 1979.
22. BRANCHINI, M. L. M. *et al.* Tipagem molecular de isolados de *Candida albicans* responsáveis por candidemia hospitalar. In: FESBE, X, 1996, (Caxambú). **Resumos da Xª Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental**, 1995. p. 453.
23. BRONDZ, I. & OLSEN, I. Review of chemosystematics: multivariate approaches to oral bacteria and yeasts. **Acta Odontol. Scand.** 50(6):321-336, 1991.

24. BROTHWELL, D. **The Bog Man and the archaeology of people.** London: British Museum Press, 1986.
25. BROWN, W. R. A., BIRD, A.P. Long-range restriction site mapping of mammalian genomic DNA. **Nature** 322(6078):477-481, 1986.
26. BRUNEAU, S., GUINET, R. Rapid identification of medically important yeasts by electrophoretic protein patterns. **FEMS Microbiol. Let.** 58:329-334, 1989.
27. BUCK, N., GAMBALE, V. Microbiota fúngica anemófila da cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Microbiol.** 46(1):9-14, 1985.
28. BUDTZ-JØRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.** 48:61-69, 1990b.
29. _____. Histopathology, immunology and serology of oral yeast infections: diagnosis of oral candidosis. **Acta Odontol. Scand.** 48:37-43, 1990a.
30. BURNETT, G. W., SCHERP, H. W., SCHUSTER, G.S. **Microbiologia oral e doenças infecciosas.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1978.
31. BURROWS, W. *et al.* **Textbook of microbiology.** 19ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1968.
32. CARLE, G. F., OLSON, M. V. An electrophoretic karyotype for yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81:3756-3760, 1985.
33. _____, FRANK, M., OLSON, M. V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science** 231:65-68, 1986.
34. CARLOTTI, A. *et al.* Microbial interactions during the production of yeast on crude sweet whey. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 36:389-394, 1991.
35. _____. *et al.* Nosocomial infection with *Candida albicans* a pancreatic transplant recipient investigated by means of restriction enzyme analysis. **J. Infection** 28(2):157-164, 1994.
36. CHALLACOMBE, S. J. Immunologic aspects of oral candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 77:202-210, 1994.

37. CHAMBERLAIN, A. Interpreting the past: human remains. British Museum Press, London, 1994.
38. CHARIFKER, M. **Contribuição ao estudo micológico do líquido bucal.** Tese (Docência-livre em Microbiologia) - Faculdade de Odontologia da Universidade do Recife, 1960.
39. CHATURVEDI, V.P., VANEGAS, R., CHAFFIN, W. L. Coordination of germ tube formation and surface antigen expression in *Candida albicans*. **FEMS - Microbiol. Lett.** 1243:99-106, 1994.
40. CHRYSSANTHOU, E. *et al.* Detection of *Candida albicans* DNA serum by polymerase chain reaction. **Scand. J. Infect. Dis.** 25(4):479-485, 1994.
41. CHU, G., VOLLRATH, D., DAVIS, R. W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. **Science** 233(4783):1582-1585, 1986.
42. CORNACCHIONI, A.B.L. *et al.* Fungemia por *Malassezia furfur* em criança imunodeprimida. **Arq.Bras.Med.** 69(2): 91-93, 1996.
43. CORREA, B. **Avaliação da eficácia do método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de amostras de leveduras não encapsuladas (*Candida albicans*) e capsuladas (*Cryptococcus neoformans*).** Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.
44. CORTINEZ, Y. J. M. *et al.* Determinación de la calidad higiénico-sanitaria de fideos frescos. **Ver. Arg. Microbiol.** 19:195-200, 1988.
45. CUCÉ, L. C. *et al.* Flora anemófila em ambiente hospitalar (PS e UTI). **An. Bras. Dermatol.** 67(4): 201-204, 1993.
46. DARLING, M. R., ARENDORF, T. M., COLDREY, N. A. Effect of cannabis use on oral candidal carriage. **J. Oral Pathol. Med.** 20(7): 319-321, 1990.
47. DARWAZEH, A. M. G. *et al.* Mixed salivary glucose levels and candidal carriage in patients with diabetes mellitus. **J. Oral Pathol. Med.** 21(6): 280-283, 1991b.
48. DAVENPORT, J. C. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. **Brit. Dent. J.** 130:151-156, 1970.

49. DAVIS, B. J. Disc electrophoresis: method and application to human serum proteins. **Ann. New York Acad. Sci.** 122(2):404-427, 1964.
50. DEL CASTILHO AGUDO, L., SORIA, A. N. & SENTANDREU, R. A method of taxonomic determination of *Candida albicans* with DNA probe. **Curr. Microbiol.** 27(1):57-60, 1993.
51. DELGADO, L. F., FISBERG, M., CARVALHO, E. S. Infecção e desnutrição. **Pedriatria Moderna** 32:633-642, 1995.
52. DEMIATE, I. M., OETTERER, M., WOSIACKI, G. A fermentação como processo de enriquecimento nutricional. **Bol. S. B. C. T. A.** 29(2):170-181, 1994.
53. DOI, M. *et al.* Electrophoretic karyotypes of isolates of *Candida albicans* from hospitalized patients. **J. Med. Vet. Mycol.** 33(2):133-140, 1994b.
54. _____ *et al.* Strain relatedness of *Candida albicans* strains isolated from children with leukemia and their bedside parents. **J. Clin. Microbiol.** 33(9): 2253-2259, 1994a.
55. DREIZEN, S. Oral candidiasis. **Am. J. Med.** 78:28-33, 1984.
56. DROUHET, E., SIMONNET, G. Candidose digestive chez le lapin. **Ann. Inst. Pasteur**, 99:235-245, 1957.
57. DUFFY, R. E. *et al.* Via oral HIV surveillance program: understanding the disease. **JADA**, 124:57-62, 1992.
58. DUNN, M. J. Gel electrophoresis of proteins. J. W. Arrowsmith Ltd., Bristol, 1986.
59. ECHEVERRIGARAY, S. *et al.* Minisatellite probes in yeast Dna fingerprinting. **Rev. Microbiol.** 27(4): 207-209, 1994.
60. EDELWEISS, M. I. A. *et al.* Infecções fúngicas em necrópcias de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). In: FESBE, X, 1995, (Caxambú). **Resumos da 10ª Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental**, 1995. p. 417.
61. ELIASSON, L. *et al.* The predominant microflora of palatal mucosa in an elderly island population. **Acta Odontol. Scand.** 52(3):163-169, 1992.

62. ESTEVES, J. A., CABRITA, J. D., NOBRE, G. N. **Micologia Médica**. Lisboa: Fundação Gulbenkian, 1977.
63. EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1989.
64. FADER, R. C. *et al.* Experimental candidiasis after thermal injury. **Infect. Immun.**, 47(3):780-784, 1985.
65. FAUX, J. A. *et al.* A comparison of different extracts of *Candida albicans* in agar gel double diffusion techniques. **J. Immunol. Meth.**, 4: 235-247, 1975.
66. FELIX, D. H., WRAY, D. The prevalence of oral candidiasis in HIV-infected individuals and dental attenders in Edinburgh. **J. Oral Pathol. Med.**, 20: 418-420, 1993.
67. FILER, J. **Disease**. London: British Museum Press, 1995.
68. FREDRICK, J. F. Historical preface to electrophoresis. **Ann. New York Acad. Sci.**, 119(2): 307-309, 1964.
69. GALLAGHER, P.J. *et al.* Reduced azole susceptibility of oral isolates of *Candida albicans* from HIV-positive patients and a derivative exhibiting colony morphology variation. **J. Gen. Microbiol.** 137(9): 1901-1911, 1992.
70. GALUSSIO, J. C., FRIDMAN, J. L., NEGRONI, R. Rapid diagnosis of pulmonary mycosis by counterimmunoelectrophoresis. **Mycopathol. Mycol. Appl.** 50(2): 143-146, 1973.
71. GAMBALE, W., PURCHIO, A., CROCE, J. Flora fúngica anemófila da grande São Paulo. **Rev. Microbiol.** 7(3):74-79, 1977.
72. _____, PURCHIO, A., PAULA, C.R. Periodicidade diária de fungos anemófilos na cidade de São Paulo, Brasil. **Rev. Microbiol.** 11(4):176-181, 1981.
73. GATERMANN, S., HEESEMANN, J., LAUFS, R. Identification of *Candida albicans* antigens recognized by sera of patients with candidiasis. **Mykosen** 28(8): 343-354, 1986.
74. GELFAND, M. S. *Candida tropicalis*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 09(6):280-283, 1989.

75. GERMAIN, M., GOURDEAU, M., HEBERT, J. Case report: familial chronic mucocutaneous candidiasis complicated by deep *Candida* infection. **Am. J. Med. Sci.** 306(4):282-283, 1994.
76. GIBBS, B.M., SHAPTON, D.A. Society for applied bacteriology, technical series n^o 2: ident. Methods for microbiologists, part B: The use of cell wall analysis and gel electrophoresis for the identification of coryneform bacteria. London: Academic Press, 1968.
77. GOTTLIEB, L. D. Electrophoretic evidence and plant systematics. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 63:161-180, 1977.
78. GRABAR, P., WILLIAMS JR., C. A., COURCON, J. Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. **Biochem. Biophys. Acta** 16:67-74, 1955.
79. GREENFIELD, R. A., JONES, J. M. Purification and characterization of a major cytoplasmic antigen of *Candida albicans*. **Infect. Immun.** 33(2):469-477, 1981.
80. _____, JONES, J. M. Comparison of cytoplasmic extracts of eight *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. **Infect. Immun.** 34(3):1157-1161, 1982.
81. HAGLER, A. N., MENDONÇA-HAGLER, L. C. Sodium chloride tolerance of yeasts isolated from a polluted estuary in Rio de Janeiro. **Rev. Microbiol.** 10(1):30-33, 1979.
82. _____, MENDONÇA-HAGLER, L. C. Vitamin requirements of yeasts isolated from polluted seawater of Rio de Janeiro. **Rev. Microbiol.** 10(3):88-91, 1979.
83. _____, SANTOS, S. S., MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts of a polluted brazilian estuary. **Rev. Microbiol.** 10(1):36-41, 1979.
84. HALL, R. Molecular approaches to taxonomy of fungi. **Botanical Review.** 35:285-304, 1969.
85. _____, ZENTMYER, G. A., ERWIN, D. C. Approach to taxonomy of *Phytophthora* through acrylamide gel-electrophoresis of protein. **Phytopathology** 59:770-774, 1969.
86. HASELWANDTER, A. Descoberta múmia no Tirol. **O Estado de São Paulo.** São Paulo, 22 de fevereiro de 1993, p. B16.

87. HASENCLEVER, H. F., KOGAN, R. M. *Candida albicans* associated with the gastrointestinal tract of the common pigeon (*Columba livia*). **Sabouraudia** 13:116-120, 1975.
88. _____, MITCHELL, W. O. Pathogenicity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Sabouraudia** 1(1):16-21, 1961.
89. _____, MITCHELL, W. O. Antigenics studies of *Candida*. Observation of two groups in *Candida albicans*. **J. Bact.** 82(4):570-573, 1961a.
90. _____, MITCHELL, W. O. Antigenics studies of *Candida*. Antigenic relation of *Candida albicans* Group A and Group B to *Candida stellatoidea* and *Candida tropicalis*. **J. Bact.** 82(4):574-577, 1961b.
91. _____, MITCHELL, W. O. Antigenics studies of *Candida*. Comparative pathogenicity of *Candida albicans* Group A, Group B and *Candida stellatoidea*. **J. Bact.** 82(4):578-581, 1961c.
92. HEIMDAHL, A, NORD, C. E. Oral yeast infections in immunocompromised and seriously diseased patients. **Acta Odontol. Scand.** 48:77-84, 1990.
93. HELENA LABORATORIES. Manual: A teoria da eletroforese. Booklet nº 10M, 07/96.
94. HENEINE, I. F. **Eletroforese em medicina**. Belo Horizonte: Lemi S.A., 1995.
95. HIRATA, C. H. W., TEICEIRA, M. S., WECKX, L. L. Manifestações otorrinolaringológicas na Aids. **Rev. Bras. Med.** 53(3): 143-157, 1996.
96. HÖFLING, J. F. **Serologia aplicada ao estudo de algumas espécies do gênero *Coffea* e suas implicações na origem de *Coffea arabica* L.** Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de Campinas, Campinas, 1976.
97. HOLMSTRUP, P., AXELL, T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infection. **Acta Odontol. Scand.** 48:57-59, 1990.
98. HOMMEL, R. K., BAUM, A., KLEBER, H.-P. Petite mutants of sophorolipid-producing *Candida* yeasts. **J. Basic Microbiol.** 34(1):57-59, 1994.

99. HWANG, S. W. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. **Appl. Microbiol.** 14(5):784-788, 1966.
100. JAAFAR, R. & PETTIT, J.H.S. *Candida albicans*: saprophyte or pathogen ? **Int.J.Dermatol.** 31(11): 783-785, 1992.
101. JANATOVA, I. Isolation of auxotrophic mutants of the methylotrophic yeast *Candida boidinii* and determination of its ploidy. **Antonie van Leeuwenhoek** 62:167-171, 1992.
102. JANBON, G. *et al.* Karyotype studies on different strains of *Candida molischiana* by pulsed-field gel electrophoresis. **Curr. Genet.** 28(2):150-154, 1995.
103. JOHNSTON, J. R., CONTOPOULOU, C. R., MORTIMER, R. K. Karyotyping of yeast strains of several genera by field inversion gel electrophoresis. **Yeast** 4(3):191-198, 1988.
104. _____, MORTIMER, R. K. Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Sacharomyces* and other yeasts. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 36(4):569-572, 1986.
105. JOLY, S. **Levantamento de leveduras ocorridas em frutos maduros: sua posição sistemática.** Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, 1954. 154 p.
106. JONES, J. S. Mummified human DNA cloned. **Nature** 314(6012): 576, 1985.
107. JORDAN, J. A. PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. **J. Clin. Microbiol.** 32(12):2962-2967, 1994.
108. JORGE JR., J., JORGE, A. O. C., TORRI, M. A. G. Quantificação de *Candida sp* na saliva de idosos institucionalizados de Piracicaba-SP. In: SEMINARIO DE PÓS-GRADUAÇÃO, V e CICLO DE CONFERÊNCIAS SOBRE O ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO, II, 1993, Piracicaba. **Resumos das Conferências**, Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 1993, 51 p.
109. JORGE, A. O. C. *et al.* Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. **J. Oral Pathol. Med.** 22:54-56, 1993.

110. _____. *et al.* Effect of sialoadenectomy on the carriage of *Candida albicans* in the mouths of rats. **J. Oral Pathol. Med.** 22:138-140, 1993.
111. JUANG, R.H.; CHANG, Y.D.; SUNG, H.Y. & SU, J.C. Oven-drying method for polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich. **Anal.Biochem.** 141: 348-350, 1984.
112. KAMOUN, P. & FREJAVILLE, J.P. **Manual de exames de laboratório.** São Paulo: Livraria Atheneu Editora, 1989.
113. KAN, V. L. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. **J. Infect Dis.** 168(3):779-783, 1993.
114. KENNEDY, M. J., VOLZ, P. A. Dissemination of yeasts after gastrointestinal inoculation in antibiotic-treated mice. **Sabouraudia** 21:27-33, 1983.
115. KOHN, L. M. Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution. **Mycologia** 84(2):139-153, 1992.
116. KOLOKOTRONIS, A. *et al.* Immunologic status in patients infected with HIV with oral candidiasis and hairy leukoplakia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 78(1):41-46, 1994.
117. KORSTANJE, M. J., STAATS, c. a. Fungal infections in the Netherlands. Prevailing fungi and pattern of infection. **Dermatology** 190(1):39-42, 1995.
118. KURTZMAN, C. P. Molecular taxonomy of yeasts. **Yeast.** 10(3): 1727-1740, 1994.
119. LACAZ, C. S. **Candidíases.** São Paulo: E.P.U., 1980
120. _____, MINAMI, P. S., PURCHIO, A. **O grande mundo dos fungos.** São Paulo: EDUSP, Ed. Polígono, 1970.
121. _____, PORTO, E., MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actionomicetos e algas de interesse médico.** São Paulo: Ed. Sarvier, 1991.
122. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. **Nature.** 228:680-685, 1970.

123. LEE, C.-F., LEE, F.-L., HSU, W.-H. Synonymy of *Candida methylica* with *Candida boidinii* and of *Candida methanolophaga* with *Candida succiphila*. **Int. Syst. Bacteriol.** 45(4):839-841, 1994.
124. LEE, F.-L. et al. *Candida galacta* comb. nov., a new combination for *Candida apis* var. *galacta*. **Inst. J. Syst. Bact.** 44(1):183-184, 1993.
125. LEE, W., BURNIE, J., MATTHEWS, R. Fingerprinting *Candida albicans*. **J. - Immunol. Meth.** 94: 177-182, 1986.
126. LENNETTE, E.H. **Manual de microbiologia clínica**. 4^a-edição, Buenos Aires: Méd. Panamerica, 1987.
127. LIGHTERMAN, I. Oral moniliasis: a complication of aureomycin therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 5 (B): 1420-1426, 1951.
128. LIN, Y. H., LEE, F. L. e HSU, W. H. Molecular and chemical taxonomy differentiation of *Candida boidinii* Ramirez strains. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47(1): 352-355, 1996.
129. LIU, W. Karyotype analysis of *Candida* species by PFGE and its use in classification. **Chung kuo I Hsueh ko Hsueh Yuan Hsueh Pao** . 18(4):310-314, 1995.
130. LODDER, J., KREGER-VAN-RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: North - Holland Publ. Co., 1952.
131. _____, KREGER-VAN-RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1970.
132. _____, KREGER-VAN-RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1984.
133. LOTT, T.J., BOIRON, P., REISS, E. An electrophoretic karyotype for *Candida albicans* reveals large chromosomes in multiples. **Mol. Gen. Genet.** 210: 170-174, 1987.
134. LYNCH, D.P. Oral candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Parthol.** 79(2): 189-193, 1994.
135. MACAMBIRA, R. et al. Miocardite infecciosa. **J. Bras. med.** (3): 49-62, 1996.
136. MAENZA, J. R. et al. Risk factors for fluconazole-resistant Candidiasis in human immuno-deficiency virus-infected patients. **J. Infects. Dis.** 173(1): 219-225, 1996.

137. MAFFEI, C. M. L. *et al.* Tipagem genotípica de cepas de *Candida albicans* isoladas de gestantes com vaginite recorrente, por fragmentos de DNA clivados com enzima de restrição. **Rev. Bras. Patol. Clín.** 30(2), 1994.
138. MAFFEI, W. E. **Os fundamentos da medicina**. 2ª-ed., vol. II, São Paulo: Ed. Artes Médicas, p. 973-982, 1978.
139. MAGALHÃES NETO, J. M., FONTES, J. A. S. Infecções adquiridas: rotura prolongada de membrana - diagnóstico e tratamento. **Ped. Moderna** 31(7):1082-1100, São Paulo, 1995.
140. MAGALHÃES, V. D., COSCINA, A. L. O emprego da biologia molecular no controle de infecções hospitalares. **LAES/HAES**, 92: 103-106, 1995.
141. MAGEE, P.T., RIKKERINK, E.H.A., MAGEE, B.B. Methods for the genetics and molecular biology of *Candida albicans*. **Anal.Biochem.** 175: 361-372, 1988.
142. MAHROUS, M. *et al.* DNA relatedness karyotyping and gene probing of *Candida tropicalis*, *Candida albicans* and its synonymus *Candida stellatoidea* and *Candida claussenii*. **Eur. J. Epidemiol.** 8(3):444-451, 1992.
143. MAIWALD, M., KAPPE, R., SONNTAG, H. G. Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Med. Vet. Mycol.** 32(2):115-122, 1994.
144. MANDEL, I.D. Smoke signals: an alert for oral disease. **J.A.D.A.** 125(7): 872-878, 1994.
145. MARQUES, S.A. *et al.* Micoses oportunisticas e de comportamento oportunista no Brasil. **An. Bras. Dermatol.** 71(Supl.2): 25-29, 1996.
146. MATES, A. Quantitative determination of *Candida albicans* in sea water. - **Microbios** 79(318): 27-30, 1994.
147. McCARTHY, J. A., DAMOGLON, A. P. The effect of substrate on the radiation resistance of yeasts isolated from sausage meat. **Lett. Appl. Microbiol.** 22(1):80-84, 1996.
148. McCULLOUGH, M. J. *et al.* Genotype and phenotype of oral *Candida albicans* from patients infected with the human immunodeficiency virus. **Microbiology** 140(5):1195-1202, 1994.

149. MELONI, B. P., LYMBERY, A. J., THOMPSON, R. C. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy and epidemiology. **J. Parasitol.** 81(3):368-383, 1995.
150. MENDES, E. **Alergia no Brasil: alérgenos regionais e imunoterapia.** São Paulo: Ed. Manole, 1989.
151. MERZ, W.G., CONNELLY, C., HIETER, P. Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.** 26(5): 842-845, 1988.
152. MEYER, E., ORDAL, Z.J. Pathogenicity of *Candida* species for the chick embryo. **J. Bact.** 52: 615-616, 1946.
153. MEYER, W. *et al.* DNA and PCR — fingerprinting in fungi. **EXS** 67:311-320, 1993.
154. MIDDELHOVEN, W.J., JONG, I.M., WINTER, M. Yeasts and fungi occurring in ensiled whole-crop maize and other ensiled vegetable crops. **Antonie van Leeuwenhoek** 57: 153-158, 1990.
155. MILLER, G.G. *et al.* Rapid identification of *Candida albicans* septicemia in man by gas-liquid chromatography. **J. Clin. Invest.** 54: 1235-1240, 1974.
156. MILLS, D., MCCLUSKEY, K. Electrophoretic karyotypes of fungi: of new cytology. **Mol. Plant-Microbe Interac.** 3(6): 351-357, 1990.
157. MONIACI, D. *et al.* Oral lesions in children born to HIV-1 positive women. **J. Oral Parthol. Med.** 22: 8-11, 1993.
158. MONOD, M. *et al.* The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis os their chromosomes. **J. Med. Microbiol.** 32: 123-129, 1990.
159. MONTEIRO, R.T.R, SEIXAS, A.S.S. Levantamento da microbiota anemófila da cidade de Rio Claro (SP). **LAES/HAES, abril-maio**, 1993.
160. MONTILLA, R. *et al.* Taxonomy and protein fingerprinting of halophilic *Vibrio* isolates from bivalves of the Ebre delta. **Can. J. Microbiol.** 41(1):64-69, 1995.

161. MORAES, P.A. **Ocorrência de dermatófitos em solos do município de Piracicaba**. Tese (Livre-Docência em Microbiologia e Imunologia) - Faculdade de Farmácia e Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, 1965.
162. MOREIRA, A.M., ALFENAS, A.C. Diferenciação de espécies de *Cylindrocladium* por meio de análise eletroforética de proteínas e isoenzimas em géis de poliacrilamida. **Fitopatologia Brasileira**, 10: 258, 1985.
163. MORHART, M. *et al.* Evaluation of enzyme immunoassay for *Candida* cytoplasmic antigens in neutropenic cancer patients. **J. Clin. microbiol.** 32(3): 766-776, 1994.
164. NAKASE, T. *et al.* *Candida sojae*: a new species of yeast isolated from an extraction process of water-soluble substances of defatted - soybean flakes. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 42: 161-169, 1994.
165. NAOUM, P. C. **Eletroforese**. 1ª ed. São Paulo: Livraria Santos, 1990.
166. NAUMOV, G. I. *et al.* Taxogenetics of *Pichia augusta* and similar methylotrophic yeasts. **Rev. Ciência e Cultura** 46(6):397-400, 1992.
167. NEDER, R. N. Introdução à Microbiologia. Instituto Zimotécnico Prof. Jayme Rocha de Almeida. Piracicaba: ESALQ/USP, 1968. 120 p.
168. _____. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: Livr. Nobel S.A., 1992.
169. NICKERSON, W. J. Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi. IV. Molecular bases of form in yeasts. **Bacteriol. Rev.** 29:305-324, 1963.
170. _____, FALCONE, G. Identification of protein disulfide reductase as a cellular division enzyme in yeasts. **Bacteriol. Rev.** 29: 305-324, 1963.
171. NIETO-RODRIGUEZ, J. A. Factors associated with the development of candidemia and candidemia-related death among liver transplant recipients. **Ann. Surg.** 225(1): 70-76, 1996.
172. NINOMIYA, A., ANTUNES, M.F.R., SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H. Fungi from soil affected by birds in the Parque estadual das fontes do Ipiranga, São Paulo state, Brazil. **Rev. Microbiol.** 26(1): 49-53, 1993.

173. NISENGARD, R. J. & NEWMAN, M. G. **Oral microbiology and immunology**. 2nd edition, Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1994.
174. NISHIMOTO, G.; TSUNODA, Y.; NAGATA, M.; YAMAGUCHI, Y.; YOSHIOKA, T. & ITO, K. Acute renal failure associated with *Candida albicans* infection. **Pediatr.Nephrol.** 11(4): 480-482, 1995.
175. NODA, H., KAWAHARA, N. Electrophoretic karyotype of intracellular yeast - like symbiotes in rice planthoppers and anobiid beetles. **J. Invertebr. Pathol.** 67(2):118-124, 1995.
176. NOGUEIRA, M.G.A. *et al.* Fungi flora of frog meat (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) slaughtered for human consume. **Rev. Microbiol.** 25(2): 112-116, 1992.
177. O'DONNELL, A. G., GOODFELLOW, M., HAWKSWORTH, D. L. Theoretical and practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganisms. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 348(1311):65-73, 1994.
178. ODDS, F. C. **Candida and candidosis**. Baltimore: Univ. Press, 1979, 352 p.
179. _____. Ecology and epidemiology of *Candida* species. **Zbl. Bakt. Hyg. A** 260: 207-212, 1984.
180. _____, ABBOTT, A.B. A simple system for the presuntive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. **Sabouraudia** 21; 301-317, 1980.
181. _____, TRUJILLO-GONZALES, A. Acid phosphatase levels in the genus *Candida* and their application to the taxonomy and identification of pathogenic. *Candida* species. **Sabouraudia** 15: 287-294, 1974.
182. OKIRI, K., KAWAMOTO, I. Two-dimensional gel electrophoresis of ribosomal proteins as a novel approach to bacterial taxonomy: application to the genus *Arthrobacter*. **Biosci Biotechnol. Biochem.** 62(9):1679-1687, 1995.
183. OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeasts infections. **Acta Odont. Scand.** 51: 71-77, 1990.
184. OLIVEIRA, G., COSTA, A.M.M. Implantação de uma secção de micologia no Departamento de Patologia Clínica do Instituto Fernandes Figueira (IFF) FioCruz. **Rev.Bras.Patol.Clín.** 33(2): 104, 1994.

185. OLIVEIRA, M.N. **Aplicação da metodologia da superfície de resposta na previsão do índice de amargor de hidrolisados de carne bovina.** Tese de Livre-Docência em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da USP de São Paulo, São Paulo, 1995.
186. OLIVER, D.E., SHILLITOE, E.J. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. **J. Oral Pathol.** 16(3): 265-270, 1984.
187. OLSEN, I. Chemotaxonomy of yeasts. **Acta Odont. Scand.** 51: 19-25, 1990.b
188. _____. Oral adhesion of yeasts. **Acta Odont. Scand.** 51: 45-53, 1990.c
189. OTÁVIO, E., OLIVEIRA COSTA, E. Novas Micoses. **O Estado de São Paulo**, 10/02/94, p. B-13.
190. PÄÄBO, S. Molecular cloning of ancient egyptian mummy DNA. **Nature** 314(6012): 644-645, 1985.
191. PACCOLA-MEIRELLES, L. D. *et al.* **Manual de técnicas eletroforéticas em microorganismos.** Piracicaba:ESALQ/FEALQ, 1988.
192. PARK, A. W., YAACOB, H. D. Pathogenic microbes of the oral environment. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.** 36(1): 1-33, 1994.
193. PASSOS, G. M. **Processos carióticos micóticos: técnicas de defesa.** Tese (Cátedra de Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia da Universidade do Recife, Pernambuco, 1961.
194. PAULA, C. R. *et al.* Oral yeasts in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. **Mycopathologia.** 112(2):119-124, 1990.
195. PFALLER, M. A. Epidemiological typing methods for mycoses. **Clin. Infect. Dis.** 14 Suppl 1:S4-S10, 1992a.
196. _____. WENZEL, R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. **Curr. Awar. Exc. Med.** 72(4):177, 1992b.
197. PIRES, M. F. C. *et al.* *Candida albicans* biotypes from the oral cavity of HIV-positive patients. **Rev. Microbiol.** 27(1):46-51, 1996.

198. PITTET, D. *et al.* Contour-champed homogeneous electric field gel electrophoresis as a powerful epidemiologic tool in yeast infections. **Am. J. Med.** 91(3B):256S-263S, 1991.
199. PONTON, J., JONES, J. M. Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot techniques. **Infect. Immun.** 53(3):565-572, 1986.
200. POPPO, I. *et al.* Altered gut barrier function to *Candida* during parenteral nutrition. **Nutrition** 10(2):151-154, 1994.
201. PORTER, S.R., SCULLY, C. Orofacial manifestations in the primary immunodeficiency disorders. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 78(1): 4-13, 1994.
202. PURCHIO, A. *et al.* Airborne fungi of baixada santista, state of Sao Paulo, Brazil. **Rev. Microbiol.** 15(4):258-265, 1984.
203. _____, GAMBALE, W., PAULA, C. R. Molds from some beaches in the southern area of Sao Paulo state (baixada santista). Brazil. **Rev. Microbiol.** 19(2): 166-171, 1988.
204. QUERINO, M. R. S. *et al.* Distribution of oral yeasts in controlled and uncontrolled diabetic patients. **Rev. Microbiol.** 25(1):37-41, 1994.
205. RAAD, I. *et al.* The broad-spectrum activity and efficacy of catheters coated with minocycline and rifampin. **J. Infect. Dis.** 173(2):418-424, 1996a.
206. _____ *et al.* Silver iontophoretic catheter: a prototype of a long-term antiinfective vascular access device. **J. Infect. Dis.** 173(2): 495-498, 1996b.
207. RAMOS FILHO, C. F. *et al.* Primeiro encontro de doenças infecciosas adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar. **Arg. Bras. Med.** 70(2):97-110, 1996.
208. RANGEL-FRAUSTO, M.S. *et al.* An experimental model for study of *Candida* survival and transmission in human volunteers. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 13(7): 590-595, 1994.
209. REDNER, P. **Pesquisa de cogumelos ceratofilicos em terras de Araraquara.** Tese (Doutor em Ciências - Parasitologia) - Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara. Araraquara, 1964.

210. REED, G., NAGODAWITHANA, T.W. **Yeast technology**. 2^a ed., New York: Van Nostrand rein hold, 1991.
211. REICHART, P. A. *et al.* *Candida* - associated palatal pappillary hyperplasia in HIV infection. **J. Oral Pathol. Oral Med.** 23: 403-405, 1994.
212. RILBE, H. Isoelectric foccusing: historical and theoretical aspects. **Ann. New lork Acad. Sci.** 209: 11-22, 1973.a
213. ROBERT, F., LEBRETON, F., BOUGNOUX, M. E. Use of random amplified polymorphic DNA as a method for *Candida albicans* in epidemiological sur of a burn unit. **J. Clin. Microbiol.** 33(9):2366-2371, 1995.
214. ROCHELLE, S. L. A. Complicações de origem fúngica no suporte nutricional. **O Mundo da Saúde** 20(7):233-237, 1996.
215. ROGERS, P. L. As fermentações. **O Correio da Unesco** 22(8):17-20, 1994.
216. ROGERS, T., BALISH, E. Experimental *Candida albicans* infection in conventional mice and germfree rats. **Infect. Immun.** 14(1): 33-38, 1976.
217. ROMANO, F., RIBERA, G., GIULIANO, M. A study of a hospital cluster of systematic candidosis using DNA typing methods. **Epidemiol. Infect.** 112(2): 393-398, 1994.
218. ROSA, E. A. *et al.* Avaliação de diferentes métodos de extração de proteínas de componentes intracelulares de leveduras da cavidade bucal. REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, XI, **Anais**, Caxambú, Minas Gerais, 1996, p. 20.017.
219. RUSSELL, C., LAY, K.M. Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. **Archs. Oral Biol.** 18(8): 957-962, 1973.c
220. RUSTCHENKO-BULGAC, E. P. Variations of *Candida albicans* electrophoretic kariotypes. **J. Bact.** 173(20):6586-6596, 1991.
221. SA, N.M.H. *et al.* Selection and characterization of *Rhizobium spp* strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Rev. Microbiol.** 24(1): 38-48, 1993.

222. SAMARANAYAKE, L.P. Oral mycoses in HIV infection. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 73: 171-180, 1992.
223. SANGEORZAN, J. A. *et al.* Epidemiology of oral Candidiasis in HIV - infected patients: colonization, infection, treatment and emergence of fluconazole resistance. **Am. J. Med.** 97(4): 339-346, 1994.
224. SARMIENTO, R., HOLUBKA, J., KHATIB, R. Case report; *Candida* meningitis with an intradural filling defect 1 year after candidemia. **Am. J. Med. Sci.** 307(2): 115-118, 1994.
225. SCHERER, S. & STEVENS, D.A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. **J.Clin.Microbiol.** 25(4): 675, 1987.
226. SCHIMIDT-WESTHAUSEN, A. *et al.* Oral *Candida* and enterobacteriaceae in Hiv-1 infection: correlation with clinical candidiasis and antimycotic therapy. **J. Oral. Pathol. Med.** 20: 469-472, 1991.
227. SCHONIAN, G. Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. **Mycoses** 36(5/6): 171-179, 1993.
228. SCHROPPEL, K., ROTMAN, M., GALASK, R. Evolution and replacement of *Candida albicans* strains during recurrent vaginitis demonstrated by DNA fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.** 32(11): 2646-2654, 1994.
229. SCHULZ, T. F. *et al.* Studies on the evolution of *Agrobacterium vitis* as based on genomic fingerprinting and IS element analysis. **System. Appl Microbiol.** 16(2):322-329, 1993.
230. SCIACCA, A. *et al.* Uso orale del l'intraconazolo in un caso di candidosi epatica neonatale. **Pediatr. Med. Chir.** 17(2): 173-175, 1995.
231. SCULLY, C., PAES DE ALMEIDA, O. Orofacial manifestations of the systematic mycoses. **J. Oral. Pathol. Med.** 21: 289-294, 1992.
232. SEDGLEY, C.M. & SAMARANAYAKE, L.P. The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in Hong-Kong chinese. **Arch.Oral Biol.** 39(6): 459-466, 1994.
233. SETTO, M.M. **Micose e bronzeado dividem espaço no verão. Jornal de Piracicaba**, Piracicaba, p. 3, 11/12/95.

234. SHAW, C.R. Electrophoretic variation in enzymes. **Science** 149(1): 936-943, 1965.
235. SHECHTER, Y. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. **Bull. Torrey bot. Club** 100(5): 253-259, 1973.
236. _____. *et al.* Comparative disc electrophoretic studies of proteins from dermatophytes. **Sabouraudia** 5(2): 144-149, 1966.
237. SHEPHERD, M.G., POULTER, R.T.M., SULLIVAN, P.A. *Candida albicans*: biology, genetics and pathogenicity. **Ann. Rev. Microbiol.** 39: 579-614, 1985.
238. SHIMIZU, M.T. **Produção de hialuronidase, condroitin sulfatase, proteinase e fosfolipase, por amostras de *Candida albicans* e sua correlação com virulência para camundongos inoculados experimentalmente.** Tese (Livre-Docência em Microbiologia Oral) - Faculdade de Odontologia da UNESP, São José dos Campos, 1990.
239. SKINNER, C.E. The yeast-like fungi: *Candida* and *Brettanomyces*. **Bact. Rev.** 10/11: 227-274, 1946/1947.
240. _____, FLETCHER, D.W. A review of the genus *Candida*. **Bact. Rev.** 24: 397-416, 1960.
241. SKINNER, F.A., PASSMORE, S.M., DAVENPORT, R.R. **Biology and activities of yeasts.** The Society for Applied Bacteriology, Symposium series nº 9. London: Academic Press, 1980.
242. SMITH, J.M.B. Candidiasis in animals in New Zealand. **Sabouraudia** 53: 220-225, 1967.
243. SMITH, M.T., YAMAZAKI, M., POOT, G.A. Dekkera, *Brettanomyces* and *Eeniella*: electrophoretic comparison of enzymes and DNA-DNA homology **Yeast** 6(4): 299-310, 1990.
244. SNELL, R.G., WILKINS, R.J. Separation of chromosomal DNA molecules from *C. albicans* by pulsed-field gel electrophoresis. **Nucleic Acid Res.** 14(11):4401-4406, 1986.
245. SOCRANSKY, S.S., MANGANIELLO, S.D. The oral microbia of man from birth to senility. **J. Periodontology** 42(8): 485-496, 1971.

246. SOLTIS, D.E. *et al.* Starch gel electrophoresis of Ferns: a compilation of griding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **Am. Fern J.** 73(1): 9-27, 1983.
247. SPENCER, J.F.T., GORIN, P.A.J. Systematics of the genus *Candida* Berkhout: proton magnetic ressonance spectra of the manans and mannose-containing polysaccharides as an aid classification. **Antonie van Leeuwenhoek** 35: 33-44, 1969.
248. _____, GORIN, P.A.J. Yeasts isolated from soils of citrus orchads and citrus waste disposal areas in California and Florida: flavonoid utilization. **Can. J. Microbiol.** 17: 871-877, 1971.
249. SRIKANTHA, T. *et al.* Partial nucleotide sequence of a single ribosomal RNA coding region and secondary structure of the large subunit 25s RNAr of *Candida albicans*. **Curr. Genet.** 16(4):321-328, 1994.
250. STEENSMA, H.Y., DE JONGH, F.C.M., LINNERSKAMP, M. The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*. **Curr. Genet.** 14: 311-317, 1988.
251. STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol. Scand.** 48: 3-10, 1990.
252. STEWARD, F.C., BARBER, J.T. The use of acrylamide gel electrophoresis in the investigation of the soluble proteins of plants. **Ann. New York Acad Sci.** 121(2): 525-531, 1964.
253. STIPES, R. J., EMERT, G. H., BROWN JR., R. D. Differentiation of *Endothia gyrosa* and *Endothia parasitica* by disc electrophoresis of intramycelial enzymes and proteins. **Mycologia** 74(1):138-141, 1982.
254. SULLIVAN, D.J. *et al.* *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidoses in HIV-infected-individuals. **Microbiology** 141(7): 1507-1521, 1995.
255. SUZUKI, M., NAKASE, T., FUKAZAWA, Y. *Candida fragi*, a new specie of anamorphic yeast isolated from fermenting strawberry. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 37: 423-429, 1991.
256. SVREEK, M. **Mushrooms**. London: Harvey's Bookshop Ltd., 1994.
257. SWEET, S. P., COOKSON, S. & CHALLACOMBE, S. J. *Candida albicans* isolates from HIV - infected and Aids patients exhibit enhanced

- adherence to epithelial cells. **J. Med. Microbiol.** 43(6):452-457, 1995.
258. TAMURA, Y. *et al.* Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum* by SDS gel electrophoresis of cell proteins. **Int. J. System. Bact.** 43(1): 111-114, 1993.
259. TANK, S.M., GAMBALE, V. Efeitos da agitação, pH, tempo e nutrientes na produção de biomassa de *Candida guilliermondii* em meios de vinhaça e melaço. **Rev. Microbiol.** 13(1): 12-21, 1982.
260. TANNER, A.C.R. *et al.* *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 36(2): 213-221, 1986.
261. TASCHDJIAN, C.L. Routine identification of *Candida albicans*: current methods and a new medium. **Mycologia** 49: 332-338, 1957.
262. TAYLOR, J.H. **Unwrapping a mummy.** London: British Museum Press, 1995.
263. THOMANN, P., GATTI, M.S.V. Avaliação de diferentes técnicas para a extração de RNA dupla fita viral. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, III, 1995, Piracicaba.
264. THORWALD, J. **O segredo dos médicos antigos.** São Paulo: Melhoramentos, 1990.
265. TOLLEY, S. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Candida albicans* phosphomannose isomerase. **J. Mol. Biol.** 237(30): 349-350, 1994.
266. TÖROK, T. *et al.* Electrophoretic karyotyping of yeasts, and southern blotting using whole chromosomes as templates for the probe preparation. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 38(4): 313-325, 1992.
267. _____, KING JR., A.D. Comparative study on the identification of food borne yeasts. **Appl. Environ. Microbiol.** 57(4): 1207-1212, 1991.
268. _____, ROCKHOLD, D., KING JR., A. D. Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. **Int. J. Food Microbiol.** 19(1):63-80, 1993.
269. TRINEL, P. A., BORG VON ZEPELIN, M. & LEPAGE, G. Isolation and preliminary characterization of the 14- to 18-kilodalton *Candida*

- albicans* antigen as a phospholipomannan containing β -1,2 — linked oligomannosides. **Infect. Immun.** 61(10):4398-4405, 1993.
270. TROUNGOS, C., HORTI, M. & KITTAS, C. A rapid method for the screening and typing of high risk HPVs using molecular biology techniques. **Anticancer Res.** 15(5B):2045-2048, 1995.
271. TUCKER, A.O., FAIRBROTHERS, D.E. Extraction of leaf proteins of *Mentha* (Labiatae) for disc-electrophoresis. **Phytochemistry** 9: 1399-1403, 1970.
272. VALDEZ, I.H., PIZZO, P. A., ATKINSON, J. C. Oral health of pediatric AIDS patients: a hospital-based study. **J. Dent. Children** 60(2):114-118, 1994.
273. VAN BELKUM, A. *et al.* PCR-mediated genotyping of *Candida albicans* strains from bone marrow transplant patients. **Bone Marrow Transplantation** 12(6):811-815, 1994.
274. VAN DER WESTHUIZEN, T.J., PRETORIUS, I.S. The value of electrophoretic fingerprinting and karyotyping in wine yeast breeding programmes. **Antonie Van Leeuwenhoek** 61(4): 249-257, 1992.
275. VAN UDEN, N. The occurrence of *Candida* and other yeasts in the intestinal tracts of animals. **Ann. New York Acad. Sci.** 88:59-68, 1960.
276. VANCANNEYT, M. *et al.* Differentiation of yeast species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. **System. Appl. Microbiol.** 13:23-32, 1991.
277. VASQUEZ, J. A. *et al.* Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsed-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Torulopsis glabrata* and *Candida* species other than *Candida albicans*. **J. clin. Microbiol.** 31(8):2021-2030, 1993.
278. VAUGHAN-MARTINI, A., MARTINI, A., CARDINALI, G. Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek** 62(2):145-156, 1993.
279. VENEZIA, R. A., ROBERTSON, R. G. Efficacy of the *Candida* precipitin test: verification with a protoplast antigen preparation. **Am. J. Clin. Pathol.** 60:849-855, 1974.
280. VIDAL, W. N., VIDAL, M. R.R. **Taxonomia vegetal.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1985.

281. WEBERLING, F., SCHWANTES, H. O. **Taxonomia vegetal**. São Paulo: E.P.U./EDUSP, 1986.
282. WHITE, G. C. *et al.* Rapid characterisation *Candida albicans* by pyrolysis mass espectrometry. **J. Med. Microbiol.** 42(2):98-105, 1994.
283. WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science** 163(3864):150-160, 1989.
284. WICKES, B., STAUDINGER, J. MAGEE, B. B. Physical and genetic mapping of *Candida albicans*: several genes previously assigned to chromosome 1 map to chromosome R, the rDNA-containing linkage group. **Infect. Immun.** 60(7):1480-1484, 1991.
285. WIGHTMAN, P., QUAIN, D. E., MEADEN, P. G. Analysis of production brewing strains of yeast by DNA fingerprinting. **Lett. Appl. Microbiol.** 22(1):90-94, 1996.
286. WILKIESON, C. *et al.* Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. **J. Oral Pathol. Med.** 21(1):13-16, 1991.
287. WILLIAMS, D. W. *et al.* Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. **J. Clin. Microbiol.** 33(9):2476-2479, 1995.
288. WILLINGER, B. *et al.* The epidemiological analysis of yeasts by pulsed field gel electrophoresis. **Mycoses** 38(Suppl. 1): 57-59, 1994.
289. _____ *et al.* Wechselfeld-gelelektrophorese zur epidemiologischen analyse von sprosspilzisolaten / Pulsed-field gel electrophoresis for the epidemiological analysis of yeast isolates. **Mycoses** 38(Suppl. 1): 57-59, 1994.
290. WISTREICH, G. A., LECHTMAN, M. D. **Microbiologia das doenças humanas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980.
291. XU, Y. Y., SAMARANAYAKE, L. P. *Candida albicans* biotypes in chinese patients with and without oral candidosis. **Arch. Oral Biol.** 39(6):577-579, 1994.
292. ZAITZ, C. Micoses em aidéticos e infecções hospitalares. **Rev. Bras. Med.** 50(9), 1362, 1994a.
293. _____. Micoses em aidéticos: tratamento. **Rev. Bras. Med.** 50(9): 1365, 1994b.